

BC

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年10月13日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/094881 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 39/395, 47/48, A61P 3/00, 5/02, 5/06, 5/18, 5/48, 7/00, 9/00, 15/00, 15/10, 15/18, 19/08, 25/00, 31/00, 35/00, 37/04三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社
内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006576

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2005年3月29日 (29.03.2005)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 國際調査報告書(30) 優先権データ:
特願2004-098595 2004年3月30日 (30.03.2004) JP2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田
薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL
COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪
市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井ノ岡 博 (IN-
OOKA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川
区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会
社内 Osaka (JP). 鈴木 伸宏 (SUZUKI, Nobuhiro) [JP/JP];
〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番
85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 小久保
利雄 (KOKUBO, Toshio) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大
阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品
工業株式会社内 Osaka (JP). 黒川 智文 (KUROKAWA,
Tomofumi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十

(54) Title: ANTIBODY DRUG

A1 (54) 発明の名称: 抗体医薬

(57) Abstract: An ameliorating agent for the stability of mammalian endogenous ligand in the blood, comprising an antibody having affinity with mammalian endogenous ligand and substantially not neutralizing the same; and preparations thereof for the prevention and treatment of diseases in accomplishment of which it is effective to increase the concentration of endogenous ligand in the blood and/or prolong the half life period thereof in the blood. When the preparations alone without being combined with a compound identical with or substantially identical with the endogenous ligand are administered to a mammal, the stability of endogenous ligand in the blood would be enhanced to thereby reinforce the receptor activity regulating action thereof.

(57) 要約: 本発明は、哺乳動物の内因性リガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体を含有してなる該内因性リガンドの血中安定性改善剤、並びに内因性リガンドの血中濃度を増加および/または血中半減期を延長させることができが予防・治療上有効である疾患の予防・治療用である上記製剤を提供する。内因性リガンドと同一もしくは実質的に同一の化合物を併用投与することなく、上記製剤を単独で哺乳動物に投与すれば、該内因性リガンドの血中安定性が増大してその受容体活性調節作用が増強される。

WO 2005/094881 A1

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2005年10月13日 (13.10.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/094881 A1(51)国際特許分類⁷: A61K 39/395, 47/48, A61P 3/00, 5/02, 5/06, 5/18, 5/48, 7/00, 9/00, 15/00, 15/10, 15/18, 19/08, 25/00, 31/00, 35/00, 37/04三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社
内 Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/006576

(74)代理人: 高島一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(22)国際出願日: 2005年3月29日 (29.03.2005)

(25)国際出願の言語: 日本語

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2004-098595 2004年3月30日 (30.03.2004) JP(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田
薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL
COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪
市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 井ノ岡博 (IN-
OOKA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川
区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会
社内 Osaka (JP). 鈴木伸宏 (SUZUKI, Nobuhiro) [JP/JP];
〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番
85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 小久保
利雄 (KOKUBO, Toshio) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大
阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品
工業株式会社内 Osaka (JP). 黒川智文 (KUROKAWA,
Tomofumi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十
三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内
Osaka (JP).

(54)Title: ANTIBODY DRUG

(54)発明の名称: 抗体医薬

(57)Abstract: An ameliorating agent for the stability of mammalian endogenous ligand in the blood, comprising an antibody having affinity with mammalian endogenous ligand and substantially not neutralizing the same; and preparations thereof for the prevention and treatment of diseases in accomplishment of which it is effective to increase the concentration of endogenous ligand in the blood and/or prolong the half life period thereof in the blood. When the preparations alone without being combined with a compound identical with or substantially identical with the endogenous ligand are administered to a mammal, the stability of endogenous ligand in the blood would be enhanced to thereby reinforce the receptor activity regulating action thereof.

(57)要約: 本発明は、哺乳動物の内因性リガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体を含有してなる該内因性リガンドの血中安定性改善剤、並びに内因性リガンドの血中濃度を増加および/または血中半減期を延長させることができが予防・治療上有効である疾患の予防・治療用である上記製剤を提供する。内因性リガンドと同一もしくは実質的に同一の化合物を併用投与することなく、上記製剤を単独で哺乳動物に投与すれば、該内因性リガンドの血中安定性が増大してその受容体活性調節作用が増強される。

WO 2005/094881 A1

明細書

抗体医薬

技術分野

本発明は抗体の新規医薬用途に関する。より詳細には、本発明は、内因性リガンドの血中安定性を改善することにより該リガンドの受容体活性化作用を増強するための、該内因性リガンドに対して親和性を有するがそれを完全には中和しない抗体の利用に関する。

背景技術

抗体はその特異性の高さと血中半減期の長さから、副作用が少なく薬効持続性が長いという医薬品としての優れた特性を備えている。疾患特異的な抗原を標的とした今日的な意味での抗体医薬第一号は、1986年に米国で急性拒絶反応治療剤として認可されたマウス抗CD3モノクローナル抗体（商品名：orthoclone）であるが、マウスモノクローナル抗体は、ヒトに投与した場合HAMA（Human Anti-Mouse Antibodies）と呼ばれる抗マウスイムノグロブリン（Ig）ヒト抗体が産生され、半減期短縮による薬効低下やアナフィラキシー症状を惹き起こす；抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）や補体依存性細胞傷害作用（CDC）を利用する場合、マウスFcではヒト体内での該作用が著しく低下する等の難点があったため、抗体医薬の開発はその後長らく頓挫していた。

しかし、1990年代に入ってキメラ抗体やヒト化抗体、さらには完全ヒト抗体の作製技術が確立し、抗原性・薬効低下の問題が回避されたことで抗体医薬は再び脚光を浴びることとなり、癌・移植拒絶・循環器疾患・感染症・自己免疫疾患など、難病治療薬を中心として次々と実用化され、臨床段階のものを含めると、現在までに100を超える抗体医薬が開発されている。

開発中のものを含め、従来の抗体医薬のほとんどは、(1)標的抗原に結合してその機能を阻害（即ち、中和）する【例：抗TNF α 抗体（商品名：レミケード）、

抗RSV表面蛋白質抗体（商品名：シナジス）]；(2)標的抗原を発現する病原細胞に薬物（例えば、化学療法剤、毒素、放射性同位元素、サイトカイン等）を送達するためのキャリアとして働く〔例：⁹⁰Y結合抗CD20抗体（商品名：Zevalin）、カリキアマイシン結合抗CD33抗体（商品名：Mylotarg）〕；(3)ADCCやCDCを利用して標的抗原を発現する細胞を攻撃する〔例：抗HER2抗体（商品名：ハーセプチン）、抗CD20抗体（商品名：リツキサン）〕のいずれかの作用機序に基づいている。
5

これに対し、次世代の抗体医薬として、標的抗原を中和したり抗原発現細胞を殺傷したりするのではなく、標的抗原の機能を増強することを目的としたいわゆるアゴニスト抗体の開発が模索されている。例えば、チロシンキナーゼ型の受容体のようにリガンドが結合することによってオリゴマーを形成し、シグナル伝達作用が活性化される受容体のモノマー分子に対する抗体を用いて、該モノマー分子同士を架橋して受容体を活性化させる方法が提唱されている（例えば、国際公開第01/79494号パンフレットを参照）。

10 しかしながら、細胞表面の受容体に対してリガンド分子として働くサイトカインや増殖因子等の体液性の生理活性ペプチド（蛋白質）を標的とする抗体医薬に関しては、標的抗原の機能（即ち、受容体活性化作用）を阻害する中和抗体が専ら利用されている。

生理活性ペプチド（蛋白質）は生体において種々の薬理作用を示すリガンド分子であることから、医薬品として利用されているが、これらはペプチダーゼ（プロテアーゼ）に対する感受性が高く、また分子量が小さいため腎クリアランスを受けやすく一般的に活性体の生体内での半減期が短い。そのため、薬効持続性に難点があり頻回投与を必要とする場合が多い。サイトカイン等の生理活性蛋白質を活性成分とする医薬を投与するに際して、蛋白質の生理活性を損なわない部位で該蛋白質と結合する抗体を併用することにより該蛋白質の血中半減期を延長させ、薬効持続性を改善しようする試みがなされているが（例えば、特表昭60-
15

502104号を参照）、実用化されるには至っていない。

また、従来の抗体医薬は、サイトカイン等の低用量で薬効を示す他のバイオ医薬品の場合とは異なり、一般に臨床投与量が莫大で数百mgに及ぶ場合もある。現在、抗体医薬はCHO細胞などの動物細胞を用いて組換え生産されているが、抗体5 產生量や培養規模に制限があるため非常に高価であり、そのため抗体医薬の適応疾患は既存の治療薬では十分な治療効果が得られない難病に限られているのが現状である。現在臨床開発中のものの中には患者数の多い慢性疾患（例：関節リウマチ）治療薬も含まれているが、今後糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の領域にまで抗体医薬の市場を拡大するためには、コスト面での課題を克服することが10 きわめて重要となる。

さらに、抗体医薬の投与量を低減することは、安全性の面からも重要である。現在開発中の抗体医薬の大半はキメラもしくはヒト化抗体であるが、これらはマウス由来の可変領域もしくはCDRを含むがために抗Igヒト抗体（HACAもしくはHAHA）を産生させてしまう場合がある。完全ヒト抗体作製技術の確立により抗Ig15 ヒト抗体産生の問題はほぼ回避されるが、抗体はその本質的宿命として宿主にとって非自己であるという性質を有しているために、大量に投与すれば抗ヒトIgヒト抗体が産生される可能性を否定できない。

発明の開示

20 本発明の目的は、従来の抗体医薬とは基本コンセプトを異にする次世代型の抗体医薬を提供することである。特に、生活習慣病などの、既存の抗体医薬が対象としておらず且つ市場規模の大きい疾患領域の治療薬として有用な新規抗体医薬を提供することである。別の側面において、本発明は、従来の抗体医薬と比較してきわめて低用量で治療効果を発揮し得る抗体医薬を提供することにより治療コースあたりの抗体使用量を低減し、もって医療経済に寄与することを目的とする。

本発明は、部分的には、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド

(PACAP) のある部分配列を抗原決定基とする抗PACAPモノクローナル抗体が、PACAPの作用（アデニル酸シクラーゼ（AC）活性化作用）を阻害しないこと、および該抗PACAP抗体を単独でマウスに投与すると、通常血中に検出されない内因性のPACAPが該抗体との複合体として検出される（即ち、血中安定化される）ことの発見に基づいている。本発明者らは、かかる知見に基づいて、投与対象動物の内因性リガンドに対して親和性を有し且つ該リガンドの作用を完全には阻害しない抗体（非中和抗体）を、該動物に単独で（即ち、該リガンドまたはその同等物を投与することなく）投与することにより、内因性リガンドの生理作用を保持させたままその血中安定性を向上（即ち、血中リガンド濃度を増大）させることができ、その結果該リガンドの受容体活性化作用を増強することができると発想した。そこで、本発明者らは、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)に対する非中和抗体を新たに作製し、これをラットに投与することにより、血漿中のGLP-1濃度を薬効が発揮される領域まで上昇させることに成功して、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- [1] 哺乳動物の内因性リガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体を含有してなる該内因性リガンドの血中安定性改善剤、
- [2] 内因性リガンドの血中安定性の改善によりその受容体活性調節作用が増強されることを特徴とする上記〔1〕記載の剤、
- [3] 抗体の中和活性が約80%以下である上記〔1〕記載の剤、
- [4] 哺乳動物に投与することにより、内因性リガンドの血中濃度が該抗体を投与していない場合の血中濃度の約2倍以上となる上記〔1〕記載の剤、
- [5] 内因性リガンドと抗体との複合体の血中半減期が該内因性リガンド単独の場合の約2倍以上である上記〔1〕記載の剤、
- [6] 遊離の内因性リガンドの血中半減期が約1週間以下である上記〔1〕記載の剤、

[7] 内因性リガンドがペプチド性化合物である上記〔1〕記載の剤、

[8] 内因性リガンドがG蛋白質共役型受容体に対するものである上記〔7〕記載の剤、

[9] 内因性リガンドがセクレチン／グルカゴンスーパーファミリーに属するものである上記〔8〕記載の剤、

[10] 内因性リガンドがGLP-1、カルシトニン、PACAP、VIPおよびそれらの類縁体からなる群より選択される上記〔9〕記載の剤、

[11] 内因性リガンドがLHRH、メタスチン、GPR7/GPR8リガンド、MSH、グレリン、アペリンおよびその類縁体からなる群より選択される上記

〔8〕記載の剤、

[12] 内因性リガンドがEPO、TPO、インシュリン、インターフェロン、成長ホルモン、GM-CSF、レプチン、アディポネクチンおよびそれらの類縁体からなる群より選択される上記〔7〕記載の剤、

[13] 内因性リガンドがANP、BNP、CNP、ベータセルリン、ベータセルリン- δ 4、アドレノメジュリンおよびそれらの類縁体からなる群より選択される上記〔7〕記載の剤、

[14] 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させることが予防・治療上有効である疾患の予防・治療用である上記〔1〕記載の剤、

[15] 疾患が代謝疾患、骨・軟骨疾患、循環器疾患、脳・神経疾患、感染症、
20 ガン、血液疾患、泌尿器疾患、不妊・勃起不全症、成長不全および免疫不全からなる群より選択される疾患の予防・治療剤である上記〔14〕記載の剤、

[16] 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させ
25 ことが予防・治療上有効である疾患の予防・治療方法であって、該内因性リガ
ンドと同一もしくは実質的に同一の化合物を投与することなく、該内因性リガ
ンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体の有効量を哺乳動物
に投与して該内因性リガンドの血中安定性を増大させることにより、その受容体

活性調節作用を増強することを特徴とする方法、および

[17] 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させ
ることが予防・治療上有効である疾患の予防・治療剤の製造のための、該内因性
リガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体の使用、

5 などに関する。

本発明の抗体は、内因性リガンドに対して親和性を有するがそれを完全には中
和しないという特性により、動物に投与すると内因性リガンドと結合してこれを
安定化し、血中リガンド濃度を増大せしめ、結果として該リガンドの受容体活性
調節作用を増強し得る。また、本発明の抗体は、元来血中に微量しか存在しない
10 リガンドを捕捉するのに十分な量で効果を奏するので、既存の抗体医薬に比べて
臨床投与量を顕著に低減することができ、より安全且つ安価な製剤を提供するこ
とができる。

図面の簡単な説明

15 図1は、各種の抗PACAPモノクローナル抗体 [(a) PA-1Na ; (b) PA-3Na ;
(c) PA-5Na ; (d) PA-6Na ; (e) PA-2Ca ; (f) PA-1Ca] とPACAP38および
その部分ペプチドならびにVIPとの結合性を示す。縦軸は〔測定された標識量
(B)〕 / 〔競合ペプチド非添加時の標識量 (B₀)〕 × 100 (%) 、横軸は競合ペプチ
ドの濃度 (M) を示す。-○- : PACAP38NH₂ ; -●- : PACAP27NH₂ ; -▲- : PACAP(4-
20 27)OH ; -■- : PACAP(1-13)OH ; -×- : VIP ; -△- : PACAP(14-38)NH₂ ; -□- :
PACAP(31-38)NH₂

図2は、各種の抗PACAPモノクローナル抗体の抗原認識部位を示す模式図であ
る。上段のボックスがPACAP38NH₂を示し、その上の各数字はアミノ酸番号を示す。
矢じりはPACAP27のプロセッシング部位を示す。ボックスの白ヌキ部分はVIPとの
25 共通のアミノ酸配列を、ハッシュ部分はVIPと相違するアミノ酸配列をそれぞれ示
す。

図3は、PACAP38NH₂に対する各種の抗PACAPモノクローナル抗体の中和活性を示す。縦軸はcAMP濃度 (pmol/10⁵細胞)、横軸は抗体濃度 (nM)を示す。-○- : PA-1Na ; -△- : PA-3Na ; -□- : PA-5Na ; -■- : PA-6Na ; -▲- : PA-2Ca ; -●- : PA-1Ca

5 図4は、抗PACAP非中和モノクローナル抗体PA-6Naの、DPP-IVによるPACAP38分解作用の抑制効果を示す。縦軸はPACAP受容体への¹²⁵I-PACAP27の結合度 (実験1と実験2とにおける残存放射活性の差を、過剰のPACAP38で受容体の結合サイトを飽和させて測定した残存放射活性を0%、PACAP38の非存在下で測定した活性を100%として%で表した)、横軸はDPP-IV発現細胞膜画分の希釈度を示す。-○- : PA-6Na存在下 ; -●- : PA-6Na非存在下

10 図5は、抗PACAP非中和モノクローナル抗体 (PA-6Na) の、組換えDPP-IVによるPACAP38分解作用の抑制効果を示す。縦軸はPACAP受容体への¹²⁵I-PACAP27の結合度 (インプットした¹²⁵I-PACAP27の放射活性を100%としたときの残存放射活性の割合) を示し、横軸はDPP-IVの希釈度を示す。-□- : PA-6Na存在かつDPP-IV阻害剤非存在下 ; -■- : PA-6NaおよびDPP-IV阻害剤共存下 ; -○- : 抗体およびDPP-IV阻害剤非存在下 ; -●- : 抗体非存在かつDPP-IV阻害剤存在下の各条件を示す。

15 図6は、GLP-1(7-36)amideに対する抗GLP-1抗体 (図6 A : GLIT2-329(1)24(非中和抗体)および図6 B : GLIT1-492(1)2(中和抗体)) のレポータージーンアッセイの結果を示す。縦軸は2nM GLP-1(7-36)amideに各濃度の抗エリスロポエチンモノクローナル抗体を反応させた場合のGLP-1活性を100%とした、抗GLP-1抗体添加時のGLP-1残存活性を示す。横軸の各数字はGLP-1(7-36)amide濃度に対する抗GLP-1抗体濃度のモル比を示す。

20 図7は、GLP-1(7-36)amideに対する抗GLP-1抗体 (GLIT2-329(1)24およびGLIT1-492(1)2) のGLP-1/GLP-1受容体結合阻害アッセイの結果を示す。縦軸は200pM GLP-1(7-36)amideに実施例3より得られた抗PACAP38NH₂非中和抗体 (PA-

6Na) を反応させた場合の I^{125} 標識 GLP-1 の GLP-1 受容体膜画分への結合量を 100% とした、抗 GLP-1 抗体添加時の I^{125} 標識 GLP-1 の GLP-1 受容体膜画分への結合率(残存結合活性)を示し、横軸の各数字は GLP-1(7-36)amide 濃度に対する抗 GLP-1 抗体濃度のモル比を示す。

5 図 8 は、抗 GLP-1 非中和モノクローナル抗体 (GLIT2-329(1)24) が DPP-IV による GLP-1(7-36)amide の分解を抑制することを示す。縦軸は DPP-IV 消化後の GLP-1(7-36)amide 残存量を ELISA で測定し、抗体および DPP-IV 非存在下の GLP-1(7-36)amide 量を 100 % として % 表示した値を示す。GLIT2-329(1)24 : GLIT2-329(1)24 存在下 ; Anti-EPO Ab : 抗エリスロポエチン抗体存在下 ; None : 抗体非存在下 ; DPP-IV(+) : DPP-IV 存在下 ; DPP-IV(-) : DPP-IV 非存在下の各条件を示す。

0 図 9 は、飽食 Wister Fatty ラット (各群 3 匹) に生理食塩水、マウス IgG (20mg/kg) および抗 GLP-1 非中和モノクローナル抗体 GLIT2-329(1)24 (20mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与して 1 日後の、血漿中 GLP-1(7-36)amide 濃度を示す。

5 発明を実施するための最良の形態

本発明の血中安定性改善剤に用いられる抗体は、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、モルモット等）の内因性リガンドに対して親和性を有し、且つ実質的にそれを中和しないものであれば特に制限はない。

0 ここで「内因性」とは、生体内（本発明においては、本発明の血中安定性改善剤の投与対象である哺乳動物の体内）に生来存在する（=内在する）ことを意味する。従って、生体内に生来存在する物質と同一物質であっても、体外から該動物に投与されたものは含まれない。

5 また、「リガンド」とは、細胞に存在して外的刺激を認識・伝達する機能を有する分子（即ち、受容体）に特異的に結合して受容体の該機能を活性化し得る（=作動性）もしくは活性化しない（拮抗性）分子を意味し、例えば、ホルモン、

サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、造血因子、神経伝達物質などが挙げられるが、これらに限定されない。

内因性リガンドを「実質的に中和しない」とは、内因性リガンド分子の生理活性（即ち、受容体活性調節作用）を全く阻害しないか、あるいは内因性リガンドが全体として、生体にとって必要な生理活性を発揮し得る程度にしか内因性リガンド分子を阻害しないことを意味する。即ち、抗体が内因性リガンドを安定化することにより血中リガンド濃度が増大するために、個々の内因性リガンド分子の活性が部分的に阻害されても全体として所望のリガンド活性を発揮し得る場合があるので、見かけ上該抗体は内因性リガンドを中和しない。本明細書においては、内因性リガンドを実質的に中和しない抗体を、以下「非中和抗体」と称する場合もある。

好ましくは、本発明に用いられる非中和抗体は、中和活性が約80%以下、より好ましくは約50%以下、特に好ましくは約20%以下のものである。ここで「中和活性」とは、内因性リガンド分子の活性を阻害する割合を意味する。リガンド活性とは受容体活性調節作用を意味し、リガンドが作動性であれば受容体の活性（エフェクターの活性調節作用）、拮抗性であれば受容体との結合性などを指標として測定することができる。中和活性は下記式により算出することができる。

$$\text{中和活性 (\%)} = ([A_{\text{free}}] - [A_{\text{bound}}]) / [A_{\text{free}}] \times 100$$

A_{free} : 抗体の非存在下におけるリガンド活性

A_{bound} : 抗体の存在下におけるリガンド活性

本発明の血中安定性改善剤が標的とする内因性リガンドは、抗体により安定化された結果増強される該リガンドの生理活性が、生体にとって望ましい効果を奏するものであれば特に制限されず、抗体よりも血中半減期の短いとなるリガンド分子であってもよい。

好ましくは、本発明により安定化され得る内因性リガンドとしては、ペプチド性化合物が例示される。ここで「ペプチド性化合物」とは、分子内に1もしくは

2以上のペプチド結合を有する任意の化合物を意味するが、好ましくは、複数のアミノ酸がペプチド結合により重合した「ペプチド」もしくは「蛋白質」が挙げられる。

本明細書においてアミノ酸配列にて示されるペプチドもしくは蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明における内因性リガンドであるペプチドもしくは蛋白質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステルの何れであってもよい。また、該ペプチドもしくは蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、該カルボキシル基がアミド化またはエステル化されていてもよい。さらに、該ペプチドもしくは蛋白質は、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が、例えばホルミル基、アセチル基などで置換されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が他の置換基（例えば、ホルミル基、アセチル基など）で置換されたものであってもよい。

あるいは、糖鎖、脂肪酸、脂質、核酸などがペプチド鎖に結合した複合蛋白質（ペプチド）も本発明におけるペプチドもしくは蛋白質に包含される。

内因性リガンドとしてのペプチド性化合物の好ましい具体例としては、例えば、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、造血因子、神経伝達物質等の生理活性物質として機能するペプチドもしくは蛋白質が挙げられる。

ホルモンの例としては、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、カルシトニン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP)、血管作動性腸管ポリペプチド (VIP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH)、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、グレリン、エリスロポエチン (EPO)、トロンボポエチン (TPO)、インシュリン、成長ホルモン、

レプチン、アディポネクチン、アドレノメジュリン、組織プラスミノーゲンアクチベーター (tPA) 、一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (scu-PA) 、二本鎖ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (tcu-PA) 、アンジオテンシン I 、アンジオテンシンIII、アンジオテンシンIIイシヒビター、
5 ブラジキニン、コルチコトロピン、ダイノルフィン、キヨートルフィン、エンドルフィン、エンケファリン、セクレチン、成長ホルモン放出因子 (GRF) 、ニューロテンシン、副甲状腺ホルモン (PTH) 、オキシトシン、パソプレシン、バソトシン、ソマトスタチン、チロトロピン放出ホルモン (TRH) 、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチンなどが挙げられる。

0 サイトカインの例としては、インターロイキン類（例：IL-1～IL-20）、インターフェロン類（例：IFN α 、IFN β 、IFN γ ）、顆粒球・マクロファージーコロニー刺激因子 (GM-CSF) 、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF) 、マクロファージーコロニー刺激因子 (M-CSF) 、腫瘍壞死因子 (TNF) 、リンホトキシン、T細胞代替因子 (TRF) 、抗原特異的サプレッサー因子 (TsF) 、可溶性免疫反応抑制因子 (SIRF) 、サプレッサー誘導因子 (SIF) 、マクロファージ活性化因子 (MAF) 、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) 、白血球遊走阻止因子 (LIF) などが挙げられる。

ケモカインの例としては、ENA-8、GCP-2、GR0- α 、GR0- β 、GR0- γ 、BCA-1、IP-10、MIG、PF-4などのCXCケモカイン、MIP-3 α 、MIP-3 β 、エオタキシン、
20 エオタキシン-2、MCP-1～4、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTESなどのCCケモカイン、リンホタクチンなどのCケモカイン、フラクタルキン、ニューロタクチンなどのCX、Cケモカインなどが挙げられる。

増殖因子の例としては、上皮増殖因子 (EGF) 、ベータセルリン、ベータセルリシン- δ 4、トランスフォーミング増殖因子- α (TGF- α) 、ヘパリン結合性EGF様増殖因子 (HB-EGF) などのEGFファミリー、血小板由来増殖因子 (PDGF) 、血管内皮増殖因子 (VEGF) などのPDGFファミリー、線維芽細胞増

殖因子（例：FGF-1～9）などのFGFファミリー、インシュリン様増殖因子（例：IGF-I、IGF-II）などのIGFファミリー、肝細胞増殖因子（HGF）などのHGFファミリー、トランスフォーミング増殖因子- β （例：TGF- β 1～5）などのTGF- β ファミリー、ニューロトロフィン類（例：NT1～5）などのNGFファミリーなどが挙げられる。

造血因子の例としては、上記EPO、TPO、GM-CSF、G-CSF、M-CSFなどが挙げられる。

神経伝達物質の例としては、上記ダイノルフィン、キョートルフィン、エンドルフィン、エンケファリンなどが挙げられる。

好ましい一実施態様において、本発明の血中安定性改善剤は、G蛋白質共役型受容体（GPCR）に対する内因性リガンドであるペプチド性化合物を安定化する。GPCRの例としては、ニューロペプチド受容体、ケモカイン受容体等のクラスA GPCR、グルカゴン受容体、カルシトニン受容体、PTH受容体等のクラスB GPCR等が挙げられるが、これらに限定されない。クラスB GPCRに対する内因性リガンドとしては、例えばGLP-1、カルシトニン、PACAP、VIPなどのセクレチン/グルカゴンスーパーファミリーに属するペプチドもしくは蛋白質が挙げられる。また、クラスB以外のGPCRに対する内因性リガンドとしては、例えばLH-RH、メタスチン、GPR7に特異的なリガンド（ニューロペプチドB（NPB）とも呼ばれる）およびGPR7、GPR8の双方に対するリガンド（ニューロペプチドW（NPW）とも呼ばれる）（本明細書ではこれらを包括してGPR7/GPR8リガンドと表記する）、MSH、グレリン、APJ受容体に特異的なリガンド（アペリン（apelin）と呼ばれる）等が挙げられる。

別の好ましい実施態様において、本発明の血中安定性改善剤は、GPCR以外の受容体に対する内因性リガンドであるペプチドもしくは蛋白質を安定化する。そのようなペプチドの例としては、ANP、BNP、CNP、ベータセルリン、ベータセルリン- δ 4、アドレノメジュリン等が、また蛋白質の例としては、EPO、TPO、イン

シュリン、インターフェロン、成長ホルモン、GM-CSF、レプチン、アディポネクチン等が挙げられる。

上記したペプチドもしくは蛋白質は、投与対象である哺乳動物にとって内因性であり且つリガンドとしての作用を保持する限り、公知のアミノ酸配列とは1も5しくは2以上のアミノ酸において異なるアミノ酸配列を有するものであってよい。ここで「リガンドとしての作用を保持する」とは受容体との結合能を保持することを意味し、作動性／拮抗性の程度は異なっていてもよい。そのような例としては、遺伝子多型、スプライスバリエント、翻訳後プロセッシングにより生じるフラグメント等が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書においては、0これらを包括して「類縁体」と称することとする。

本発明は、非中和抗体を作製し得る限り、ペプチド性化合物以外のいかなる内因性リガンドにも適用することができる。そのような内因性リガンドとしては、例えば、ステロイド（例：グルココルチコイド、エストラジオール、エストリオール、テストステロン等）などの非ペプチド性ホルモン、生体アミン類（例：アドレナリン、ドーパミン、ヒスタミン、アセチルコリン、ノルアドレナリン等）、脂質（例：アナンダミド、カンナビノイド、ロイコトリエン、リソホスファチジン酸、血小板活性化因子等）、脂肪酸（例：GPR40リガンド等）、エイコサノイド（例：プロスタグランジン、トロンボキサン等）、胆汁酸（例：TGR5リガンド等）、アミノ酸もしくはその誘導体（例：代謝性グルタミン酸、GABA等）、ブリンもしくは核酸（例：アデノシン、cAMP、ATP、UTP、ADP、UDP等）などの、GPCRや核内受容体に対するリガンドが挙げられる。

本発明の血中安定性改善剤は、抗体との免疫複合体形成により内因性リガンドの血中半減期を延長することを特徴とする。例えば、生理活性ペプチドのようなペプチド性の内因性リガンドは、生体内のペプチダーゼによる分解を受け易く、25また腎クリアランスが早いことなどから、血中半減期が非常に短い。一方、抗体の血中半減期は非常に長く、例えば完全抗体分子の場合、通常約3週間といわれ

ている。生理活性ペプチドがそれに対する抗体と免疫複合体を形成すると、抗体分子によってペプチダーゼなど、生理活性ペプチドを不安定化する因子がペプチド分子の標的切断部位に近づけなくなる、またペプチド-抗体複合体としての分子サイズが大きくなり腎クリアランスを受け難くなる等の理由により、該ペプチドの血中安定性が向上する（例えば、GLP-1やPACAP等のペプチドは、ジペプチジルペプチダーゼ-IV（本明細書においては、DPP-IVと略記する場合がある）によりN末端が切断されるが、その結果生じるフラグメントは受容体に対してアンタゴニスト活性を有するので、これらのペプチドに対する非中和抗体を含有する本発明の血中安定性改善剤は、該ペプチドのDPP-IVによる分解抑制剤として特に有用である）。

従って、本発明の血中安定性改善剤は、遊離状態での血中半減期が抗体より短い内因性リガンド（具体的には、遊離状態での血中半減期が約1週間以下である内因性リガンド）の血中安定性改善に一般に用いることができるが、好ましくは、遊離状態での血中半減期が約1日以下、より好ましくは約12時間以下、いっそく好ましくは約6時間以下、特に好ましくは2時間以下、最も好ましくは1時間以下である内因性リガンドなどに適用することができる。

本発明に用いられる抗体は、抗原である内因性リガンドを実質的に中和しない限り、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、通常、抗原を中和することなく結合し得る領域は限定されるので、比較的容易に非中和抗体を得るにはモノクローナル抗体を使用することが好ましい。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。

また、本発明に用いられる抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域（CDR）を少なくとも有するものであれば特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分

子、あるいはポリエチレングリコール (PEG) 等の蛋白質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

本発明に用いられる抗体がモノクローナル抗体である場合、例えば、以下の方
法によって調製することができる。

5 (1) 免疫原の調製

免疫原としては、標的抗原またはその誘導体と同一の抗原決定基を 1 種あるいは 2 種以上有する化合物を使用することができる。例えば、標的抗原がペプチドもしくは蛋白質などのペプチド性化合物である場合には、該抗原またはその誘導
0 体は、(a) 例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の抗原産生組織
または細胞から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて単離・精製す
る、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する自体公知のペプチド合成方法
で化学的に合成する、あるいは(c) 該抗原またはその誘導体をコードする DN
Aを含有する形質転換体を培養する、(d) 該抗原またはその誘導体をコードす
る核酸を鋳型として無細胞転写／翻訳系を用いて生化学的に合成することによっ
5 て取得することができる。

(a) 哺乳動物の組織または細胞から抗原を調製する場合、該組織または細胞を
ホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を自体
公知の蛋白質分離技術（例：塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、
イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどのクロ
0 マトグラフィー等）に付すことにより単離・精製することができる。得られた抗
原ペプチド（蛋白質）をそのまま免疫原とすることもできるし、ペプチダーゼ等
を用いた限定分解により部分ペプチドを調製してそれを免疫原とすることもでき
る。

(b) 化学的に抗原もしくはそのフラグメントまたはその誘導体を合成する場合、
該合成ペプチドとしては、例えば、上述した天然より精製される抗原ペプチド
:5 (蛋白質) と同一の構造を有するもの、具体的には、該抗原ペプチド（蛋白質）

のアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチドなどが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いて抗原もしくはそのフラグメントまたはその誘導体を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法など〕に従って作成することができる。該クローニング方法としては、例えば、(i)抗原ペプチド(蛋白質)をコードする遺伝子配列に基づきデザインしたDNAプローブを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により該抗原をコードするDNAを単離するか、(ii)抗原ペプチド(蛋白質)をコードする遺伝子配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、cDNAを鑄型としてPCR法により該抗原もしくはそのフラグメントをコードするDNAを調製し、該DNAを宿主に適合する発現ベクターに挿入した後、該発現ベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体を適当な培地中で培養する方法などが挙げられる。

(d) 無細胞転写／翻訳系を利用する場合、上記(c)と同様の方法により調製した抗原もしくはそのフラグメントをコードするDNAを挿入した発現ベクター(例えば、該DNAがT7、SP6プロモーター等の制御下におかれた発現ベクターなど)を鑄型とし、該プロモーターに適合するRNAポリメラーゼおよび基質(NTPs)を含む転写反応液を用いてmRNAを合成した後、該mRNAを鑄型として公知の無細胞翻訳系(例:大腸菌、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽等の抽出液)を用いて翻訳反応を行わせる方法などが挙げられる。塩濃度等を適当に調整することにより、転写反応と翻訳反応を同一反応液中で一括して行うことができる。

免疫原としては完全な抗原ペプチド(蛋白質)分子や部分アミノ酸配列を有するペプチドを用いることができる。完全な抗原ペプチドを免疫原とする場合は、

中和活性および抗原決定基マッピングを指標に選抜を行うこととなる。一方、特定の抗原決定基（エピトープ）を認識する抗体を系統的に作製して中和活性を指標に選抜を行う場合には、免疫原として抗原ペプチド（蛋白質）の部分アミノ酸配列を有するペプチドが用いられる。

5 部分アミノ酸配列としては、例えば3個以上の連続するアミノ酸残基からなるもの、好ましくは4個以上、より好ましくは5個以上、いっそう好ましくは6個以上の連続するアミノ酸残基からなるものが挙げられる。あるいは、該アミノ酸配列としては、例えば20個以下の連続するアミノ酸残基からなるもの、好ましくは18個以下、より好ましくは15個以下、いっそう好ましくは12個以下の0 連続するアミノ酸残基からなるものが挙げられる。これらのアミノ酸残基の一部（例：1ないし数個）は置換可能な基（例：Cys、水酸基等）によって置換されてもよい。免疫原として用いられるペプチドは、このような部分アミノ酸配列を1ないし数個含むアミノ酸配列を有する。

5 このようなペプチドは、上記（b）～（d）の方法に従って、または上記（a）～（d）の方法により調製した抗原ペプチド（蛋白質）またはその誘導体を適当なペプチダーゼ等で切断することによって製造することができるが、種々の部分アミノ酸配列を有するペプチドを系統的に調製するには、公知のペプチド合成法を用いるのが好ましい。

10 ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の1)または2)に記載された方法等が挙げられる。

1) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

2) Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New

York (1965年)

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、
5 公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、
公知の方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、
10 4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、
15 自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはケロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。
20 これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOOBtなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水

物またはHO B t エステルあるいはHO O B t エステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～約50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5ないし約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキ

シル基の保護基としては、たとえばC₁ - 6 アルキル基、C₃ - 8 シクロアルキル基、C₇ - 14 アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシルおよびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えばアセチル基などの低級(C₁ - 6)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBz1、C1-Bz1, 2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、たとえばTos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBT)とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタシスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれ

らの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20°C ~40°Cの温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオ5 アニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、0 1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

ペプチドのアミド体を得る別 の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた5 ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要20 画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

例えば、後述の実施例において詳述する通り、固相法によりPACAP38NH₂あるいはPACAP38NH₂の部分ペプチドを合成する場合には、不溶性樹脂として当該技術分野で知られたもの、例えばクロロメチル樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹

脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂等これら何れかの樹脂を用い、PACAP38NH₂あるいはPACAP38NH₂の部分ペプチドのC末端側から保護アミノ酸を常法に従って順次縮合する。次いでフッ化水素処理で全保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィー等のそれ自体公知の方法による精製後、目的とする
5 PACAP38NH₂あるいはPACAP38NH₂の部分ペプチドを得ることができる。

例えば、N-保護アミノ酸としては、 α -アミノ基をBoc基で保護し (Boc-Xaaのように表記する) 、セリンおよびスレオニンの水酸基はBzl基で (Ser(Bzl)のように表記する) 、グルタミン酸、アスパラギン酸の ω -カルボン酸はOBzl基で (Glu(OBzl)のように表記する) 、リジンの ϵ -アミノ基はCl-Z基で (Lys(Cl-Z)と表記する) 、チロシンの水酸基はBr-Z基で (Tyr(Br-Z)と表記する) 、アルギニンのグアニド基はTos基で (Arg(Tos)と表記する) 、ヒスチジンのイミダゾール基はTos基で (His(Tos)と表記する) 保護する方法で製造することができる。
.0
.5

抗原は、免疫原性を有していれば不溶化したものを直接免疫することもできるが、分子内に1ないし数個の抗原決定基しか有しない低分子量（例えば、分子量約3,000以下）の抗原（例えば、上記のペプチドなど）を用いる場合には、これらの抗原は通常免疫原性の低いハプテン分子なので、適当な担体（キャリアー）に結合または吸着させた複合体として免疫することができる。担体としては天然もしくは合成の高分子を用いることができる。天然高分子としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のサイログロブリン、例えばニワトリのオボアルブミン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) などが用いられる。合成高分子としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または共重合物などの各種ラテックスなどが挙げられる。該キャリアーとハプテンとの混合比は、担体に結合あるいは吸着させた抗原に対する抗体が効率よく產生されれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよ
.0
.5

く、通常ハプテンに対する抗体の作製にあたり常用されている上記の天然もしくは合成の高分子キャリヤーを、重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。

ハプテンとキャリヤーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができる。
5 例えは、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同士を架橋するグルタルアルデヒトなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同士を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同士を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えは、SPDPなど）
10 を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることも
15 できる。

（2）モノクローナル抗体の作製

抗原は、温血動物に対して、例えは腹腔内注入、静脈注入、皮下注射、皮内注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロントアジュバントや不完全フロントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えはサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ニワトリなどが挙げられる。抗Ig抗体産生の問題を回避するためには投与対象と同一種の哺乳動物を用いることが好ましいが、モノクローナル抗体作製には一般にマウスおよびラットが好ましく用いられる。

ヒトに対する人為的免疫感作は倫理的に困難であることから、本発明の血中安

定性改善剤がヒトを対象とする場合には、(i)後述する方法に従って作製されるヒト抗体産生動物（例：マウス）を免疫してヒト抗体を得る、(ii)後述する方法に従ってキメラ抗体、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体を作製する、あるいは(iii)体外免疫法とウイルスによる細胞不死化、ヒトーヒト（もしくはマウス）

5 ハイブリドーマ作製技術、ファージディスプレイ法等とを組み合わせてヒト抗体を得ることが好ましい。尚、体外免疫法は、通常の免疫では抗体産生が抑制される抗原に対する抗原を取得できる可能性があることの他、 $n\text{ g} \sim \mu\text{ g}$ オーダーの抗原量で抗体を得ることが可能であること、免疫が数日間で終了することなどから、不安定で大量調製の困難な抗原に対する抗体を得る方法として、非ヒト動物

10 由来の抗体を調製する場合にも好ましく用いられ得る。

体外免疫法に用いられる動物細胞としては、ヒトおよび上記した温血動物（好ましくはマウス、ラット）の末梢血、脾臓、リンパ節などから単離されるリンパ球、好ましくはBリンパ球等が挙げられる。例えば、マウスやラット細胞の場合、4～12週齢程度の動物から脾臓を摘出・脾細胞を分離し、適当な培地（例：ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、ハムF12培地等）で洗浄した後、抗原を含む胎仔ウシ血清（FCS；5～20%程度）添加培地に浮遊させて4～10日間程度 CO_2 インキュベーターなどを用いて培養する。抗原濃度としては、例えば0.05～5 $\mu\text{ g}$ が挙げられるがこれに限定されない。同一系統の動物（1～2週齢程度が好ましい）の胸腺細胞培養上清を常法に従って調製し、培地に添加することが好ましい。

ヒト細胞の体外免疫では、胸腺細胞培養上清を得ることは困難なので、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6等数種のサイトカインおよび必要に応じてアジュバント物質（例：ムラミルジペプチド等）を抗原とともに培地に添加して免疫感作を行うことが好ましい。

25 モノクローナル抗体の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物（例：マウス、ラット）もしくは動物細胞（例：ヒト、マウス、ラット）から抗体価の上昇

が認められた個体もしくは細胞集団を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取もしくは体外免疫後4～10日間培養した後に細胞を回収して抗体産生細胞を単離し、これと骨髄腫細胞とを融合させることにより抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗体価の測定は、例えば標識化抗原5と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。

骨髄腫細胞は多量の抗体を分泌するハイブリドーマを産生し得るものであれば特に制限はないが、自身は抗体を産生もしくは分泌しないものが好ましく、また、細胞融合効率が高いものがより好ましい。また、ハイブリドーマの選択を容易に0するために、HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）感受性の株を用いることが好ましい。例えばマウス骨髄腫細胞としてはNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が、ラット骨髄腫細胞としてはR210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3等が、ヒト骨髄腫細胞としてはSKO-007、GM 1500-6TG-2、LICR-LON-HMy2、UC729-6等が挙げられる。

融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタイルの方法〔ネイチャー5(Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従って実施することができる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。PEGの分子量は特に制限はないが、低毒性で且つ粘性が比較的低いPEG1000～PEG6000が好ましい。PEG濃度としては例えば10～80%程度、好ましくは30～50%程度が例示される。PEGの希釀用溶液としては無血清培地(例: RPMI1640)、5～20%程度の血清を含む完全培地、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリス緩衝液等の各種緩衝液を用いることができる。所望によりDMSO(例: 10～20%程度)を添加することもできる。融合液のpHとしては、例えば4～10程度、好ましくは6～8程度が挙げられる。

抗体産生細胞(脾細胞)数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1:5程度であり、通常20～40°C、好ましくは30～37°Cで通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗体産生細胞株はまた、リンパ球をトランスフォームし得るウイルスに抗体産生細胞を感染させて該細胞を不死化することによっても得ることができる。そのようなウイルスとしては、例えばエプスタイン-バー (EB) ウィルス等が挙げられる。大多数の人は伝染性单核球症の無症状感染としてこのウイルスに感染した
5 経験があるので免疫を有しているが、通常のEBウイルスを用いた場合にはウイルス粒子も産生されるので、適切な精製を行うべきである。ウイルス混入の可能性のないEBシステムとして、B リンパ球を不死化する能力を保持するがウイルス粒子の複製能力を欠損した組換えEBウイルス（例えば、潜伏感染状態から溶解感染状態への移行のスイッチ遺伝子における欠損など）を用いることもまた好ましい。
0 マーモセット由来のB95-8細胞はEBウイルスを分泌しているので、その培養上清を用いれば容易にB リンパ球をトランスフォームすることができる。この細胞を例えば血清及びペニシリン／ストレプトマイシン (P/S) 添加培地（例：RPMI1640）もしくは細胞増殖因子を添加した無血清培地で培養した後、濾過もしくは遠心分離等により培養上清を分離し、これに抗体産生B リンパ球を適當な濃度（例：約 10^7 細胞/mL）で浮遊させて、通常20～40°C、好ましくは30～37°Cで通常0.5～2時間程度インキュベートすることにより抗体産生B 細胞株を得ることができる。ヒトの抗体産生細胞が混合リンパ球として提供される場合、大部分の人はEBウイルス感染細胞に対して傷害性を示すT リンパ球を有しているので、トランسفォーメーション頻度を高めるためには、例えばヒツジ赤血球等とE ロゼットを形成させることによってT リンパ球を予め除去しておくことが好ましい。
5 また、可溶性抗原を結合したヒツジ赤血球を抗体産生B リンパ球と混合し、パーコール等の密度勾配を用いてロゼットを分離することにより標的抗原に特異的なリンパ球を選別することができる。さらに、大過剰の抗原を添加することにより抗原特異的なB リンパ球はキャップされて表面にIgGを提示しなくなるので、抗IgG
10 抗体を結合したヒツジ赤血球と混合すると抗原非特異的なB リンパ球のみがロゼットを形成する。従って、この混合物からパーコール等の密度勾配を用いてロゼ

ット非形成層を採取することにより、抗原特異的Bリンパ球を選別することができる。

トランスフォーメーションによって無限増殖能を獲得したヒト抗体分泌細胞は、抗体分泌能を安定に持続させるためにマウスもしくはヒトの骨髓腫細胞と戻し融合させることができる。骨髓腫細胞としては上記と同様のものが用いられ得る。

ハイブリドーマのスクリーニング、育種は通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加して、5～20% FCSを含む動物細胞用培地（例：RPMI1640）もしくは細胞増殖因子を添加した無血清培地で行われる。ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンの濃度としては、例えばそれぞれ約0.1mM、約0.4μMおよび約0.016mM等が挙げられる。ヒトマウスハイブリドーマの選択にはウツバイン耐性を用いることができる。ヒト細胞株はマウス細胞株に比べてウツバインに対する感受性が高いので、10⁻⁷～10⁻³M程度で培地に添加することにより未融合のヒト細胞を排除することができる。

ハイブリドーマの選択にはフィーダー細胞やある種の細胞培養上清を用いることが好ましい。フィーダー細胞としては、ハイブリドーマの出現を助けて自身は死滅するように生存期間が限られた異系の細胞種、ハイブリドーマの出現に有用な増殖因子を大量に産生し得る細胞を放射線照射等して増殖力を低減させたもの等が用いられる。例えば、マウスのフィーダー細胞としては、脾細胞、マクロファージ、血液、胸腺細胞等が、ヒトのフィーダー細胞としては、末梢血単核細胞等が挙げられる。細胞培養上清としては、例えば上記の各種細胞の初代培養上清や種々の株化細胞の培養上清が挙げられる。

また、ハイブリドーマは、抗原を蛍光標識して融合細胞と反応させた後、蛍光活性化セルソータ（FACS）を用いて抗原と結合する細胞を分離することによっても選択することができる。この場合、標的抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマを直接選択することができるので、クローニングの労力を大いに軽減することが可能である。

標的抗原に対するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマのクローニングには種々の方法が使用できる。

アミノプロテリンは多くの細胞機能を阻害するので、できるだけ早く培地から除去することが好ましい。マウスやラットの場合、ほとんどの骨髄腫細胞は10~14
5 日以内に死滅するので、融合2週間後からはアミノプロテリンを除去することができる。但し、ヒトハイブリドーマについては通常融合後4~6週間程度はアミノプロ
テリン添加培地で維持される。ヒポキサンチン、チミジンはアミノプロテリン除去
後1週間以上後に除去するのが望ましい。即ち、マウス細胞の場合、例えば融合7
10 ~10日後にヒポキサンチンおよびチミジン (HT) 添加完全培地（例：10% FCS添
加RPMI1640）の添加または交換を行う。融合後8~14日程度で目視可能なクロー
ンが出現する。クローンの直径が1mm程度になれば培養上清中の抗体量の測定が
可能となる。

抗体量の測定は、例えば標的抗原またはその誘導体あるいはその部分ペプチド
(抗原決定基として用いた部分アミノ酸配列を含む) を直接あるいは担体とともに
15 吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、
次に放射性物質（例：¹²⁵I, ¹³¹I, ³H, ¹⁴C）、酵素（例：β-ガラクトシダーゼ、
β-グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸
脱水素酵素）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシア
ネート）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシ
20 ゲニン）などで標識した抗免疫グロブリン (IgG) 抗体（もとの抗体產生細胞が
由来する動物と同一種の動物由来のIgGに対する抗体が用いられる）またはプロ
テインAを加え、固相に結合した標的抗原（抗原決定基）に対する抗体を検出す
る方法、抗IgG抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養
25 上清を添加し、上記と同様の標識剤で標識した標的抗原またはその誘導体あるいは
その部分ペプチドを加え、固相に結合した標的抗原（抗原決定基）に対する抗
体を検出する方法などによって行うことができる。

クローニング方法としては限界希釈法が通常用いられるが、軟寒天を用いたクローニングやFACSを用いたクローニング（上述）も可能である。限界希釈法によるクローニングは、例えば以下の手順で行うことができるがこれに限定されない。

上記のようにして抗体量を測定して陽性ウェルを選択する。適当なフィーダー

5 細胞を選択して96ウェルプレートに添加しておく。抗体陽性ウェルから細胞を吸い出し、完全培地（例：10% FCSおよびP/S添加RMPI1640）中に30細胞/mLの密度となるように浮遊させ、フィーダー細胞を添加したウェルプレートに0.1mL（3細胞/ウェル）加え、残りの細胞懸濁液を10細胞/mLに希釈して別のウェルに同様にまき（1細胞/ウェル）、さらに残りの細胞懸濁液を3細胞/mLに希釈して別のウェルにまく（0.3細胞/ウェル）。目視可能なクローンが出現するまで2～3週間程度培養し、抗体量を測定・陽性ウェルを選択し、再度クローニングする。ヒト細胞の場合はクローニングが比較的困難なので、10細胞/ウェルのプレートも調製しておく。通常2回のサブクローニングでモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができるが、その安定性を確認するためにさらに数ヶ月間定期的に再10 クローニングを行うことが望ましい。

ハイブリドーマはインビトロまたはインビボで培養することができる。

インビトロでの培養法としては、上記のようにして得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、細胞密度を例えば $10^5 \sim 10^6$ 細胞/mL程度に保ちながら、また、FCS濃度を徐々に減らしながら、ウェルプレートから徐々にスケールアップしていく方法が挙げられる。

インビボでの培養法としては、例えば、腹腔内にミネラルオイルを注入して形質細胞腫（MOPC）を誘導したマウス（ハイブリドーマの親株と組織適合性のマウス）に、5～10日後に $10^6 \sim 10^7$ 細胞程度のハイブリドーマを腹腔内注射し、2～5週間後に麻酔下に腹水を採取する方法が挙げられる。

25 モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例：塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿

法、電気泳動法、イオン交換体（例：DEAE、QAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など】に従って行われる。

5 以上のようにして、ハイブリドーマを温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、モノクローナル抗体を製造することができる。

本発明に用いられる抗体は抗原である内因性リガンドを実質的に中和しないものでなければならないので、得られたモノクローナル抗体の中和活性の程度について調べる必要がある。中和活性は、抗体の存在下および非存在下におけるリガンドに対する受容体のエフェクター活性調節作用、あるいはリガンドと受容体との結合性を比較することにより測定することができる。例えば、内因性リガンドがアデニル酸シクラーゼ（AC）活性を促進もしくは抑制するG蛋白質と共に役するGPCRに対するものである場合、リガンドの単独存在下およびリガンド-抗体複合体の存在下において、例えば、1)該GPCRおよびACを細胞膜上に含む細胞もしくはその膜画分にATPを添加し、生成するcAMP量を、抗cAMP抗体を用いて放射性物質（例： ^{125}I ）、酵素（例：アルカリホスファターゼ、ペーオキシダーゼ）、蛍光物質（例：FITC、ローダミン）等で標識したcAMPとの競合イムノアッセイにより測定する方法、2)上記細胞もしくはその膜画分に[α - ^{32}P]ATPを添加し、生成する [^{32}P]cAMPをアルミナカラム等で分離後、その放射活性を測定する方法、3)cAMP応答エレメント（CRE）の制御下にあるリポーター遺伝子（例：ルシフェラーゼ遺伝子）を導入した形質転換細胞における該遺伝子の発現量を測定する方法、4)該GPCRを含む膜画分に [^{35}S]GTP γ S（G蛋白質 α サブユニットのGTPase活性によって加水分解を受けないGTPアナログ）を添加し、膜に結合した放射活性を測定する方法、5)該GPCRとリガンドとの結合を、放射性物質（例： ^{125}I ）、酵素（例：アルカリホスファターゼ、ペーオキシダーゼ）、蛍光物質（例：FITC、

ローダミン) 等で標識した該リガンドとの競合イムノアッセイにより測定する方法等が挙げられる。内因性リガンドに対する受容体がホスホリパーゼC (PLC) をエフェクターとするGPCRである場合には、上記1)～3)に代えて、1)該GPCRおよびPLCを細胞膜に含む細胞もしくはその膜画分にホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸を添加し、生成するイノシトールリン酸量を測定する方法、2)該GPCRおよびPLCを細胞膜に含む細胞内のCa²⁺量を測定する方法、3)Ca²⁺によりアップレギュレートされるTPA (12-0-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート) 応答エレメント (TRE) の制御下にあるリポーター遺伝子を導入した形質転換細胞における該遺伝子の発現量を測定する方法等を用いることができる。尚、細胞内Ca²⁺量は、蛍光プローブ (fura-2、indo-1、fluor-3、Calcium-Green I 等) を用いて分光学的に測定するか、カルシウム感受性発光蛋白質であるエクオリン等を用いて測定することができる。蛍光プローブを用いた分光学的測定に適した装置として、FLIPR (Molecular Devices社) システムが挙げられる。

上記の測定法を実施した結果、例えば、中和活性が約80%以下、好ましくは約50%以下、より好ましくは約20%以下の抗体を、本発明に用いられる非中和抗体の候補として選択することができる。

好ましい実施態様において、本発明の血中安定性改善剤はヒトを投与対象とする医薬品であることから、本発明に用いられる抗体 (好ましくはモノクローナル抗体) はヒトに投与した場合に抗原性を示す危険性が低減された抗体、具体的には、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、マウスヒトキメラ抗体などであり、特に好ましくは完全ヒト抗体である。ヒト化抗体およびキメラ抗体は、後述する方法に従って遺伝子工学的に作製することができる。また、完全ヒト抗体は、上記したヒトヒト (もしくはマウス) ハイブリドーマより製造することも可能ではあるが、大量の抗体を安定に且つ低コストで提供するためには、後述するヒト抗体産生動物 (例: マウス) またはファージディスプレイ法を用いて製造することが望ましい。

(1) キメラ抗体の作製

本明細書において「キメラ抗体」とは、H鎖およびL鎖の可変領域 (V_H および V_L) の配列がある哺乳動物種に由来し、定常領域 (C_H および C_L) の配列が他の哺乳動物種に由来する抗体を意味する。可変領域の配列は、例えばマウス等の容易にハイブリドーマを作製することができる動物種由来であることが好ましく、定常領域の配列は投与対象となる哺乳動物種由来であることが好ましい。

キメラ抗体の作製法としては、例えば米国特許第6,331,415号に記載される方法あるいはそれを一部改変した方法などが挙げられる。具体的には、まず、上述のようにして得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ（例えば、マウスマウスハイブリドーマ）から、常法に従ってmRNAもしくは全RNAを調製し、cDNAを合成する。該cDNAを鑄型として、適当なプライマー（例えば、センスプライマーとして V_H および V_L の各N末端配列をコードする塩基配列を含むオリゴDNA、アンチセンスプライマーとして C_H および C_L のN末端配列をコードする塩基配列とハイブリダイズするオリゴDNA（例えばBio/Technology, 9: 88-89, 1991 参照））を用い、常法に従ってPCRで V_H および V_L をコードするDNAを増幅・精製する。同様の方法により、他の哺乳動物（例：ヒト）のリンパ球等より調製したRNAからRT-PCRにより C_H および C_L をコードするDNAを増幅・精製する。常法を用いて V_H と C_H 、 V_L と C_L をそれぞれ連結し、得られたキメラH鎖DNAおよびキメラL鎖DNAを、それぞれ適当な発現ベクター（例えば、CHO細胞、COS細胞、マウス骨髄腫細胞等で転写活性を有するプロモーター（例：CMVプロモーター、SV40プロモーター等）を含むベクターなど）に挿入する。両鎖をコードするDNAは別個のベクターに挿入してもよいし、1個のベクターにタンデムに挿入してもよい。得られたキメラH鎖およびキメラL鎖発現ベクターで宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては、動物細胞、例えば上記したマウス骨髄腫細胞の他、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、サル由来のCOS-7細胞、Vero細胞、ラット由来のGHS細胞などが挙げられる。形質転換は動物細胞に適用可能となる方法を用

いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法などが挙げられる。宿主細胞に適した培地中で一定期間培養後、培養上清を回収して上記と同様の方法で精製することにより、キメラモノクローナル抗体を単離することができる。あるいは、宿主細胞としてウシ、ヤギ、ニワトリ等のトランスジェニック技術が確立し、

5 且つ家畜（家禽）として大量繁殖のノウハウが蓄積されている動物の生殖系列細胞を用い、常法によってトランスジェニック動物を作製することにより、得られる動物の乳汁もしくは卵から容易に且つ大量にキメラモノクローナル抗体を得ることもできる。さらに、トウモロコシ、イネ、コムギ、ダイズ、タバコなどのトランジエニック技術が確立し、且つ主要作物として大量に栽培されている植物細胞を宿主細胞として、プロトプラストへのマイクロインジェクションやエレクトロポレーション、無傷細胞へのパーティクルガン法やTiベクター法などを用いてトランジエニック植物を作製し、得られる種子や葉などから大量にキメラモノクローナル抗体を得ることも可能である。

得られたキメラモノクローナル抗体をパパインで分解すればFabが、ペプシンで分解すれば $F(ab')_2$ がそれぞれ得られる。

また、マウス V_H および V_L をコードするDNAを適当なリンカー、例えば1～40アミノ酸、好ましくは3～30アミノ酸、より好ましくは5～20アミノ酸からなるペプチド（例：[Ser-(Gly)_m]_nもしくは[(Gly)_m-Ser]_n（mは0～10の整数、nは1～5の整数）等）をコードするDNAを介して連結することによりscFvとすることができ、
20 さらに C_{H3} をコードするDNAを適当なリンカーを介して連結することによりminidodyモノマーとしたり、 C_H 全長をコードするDNAを適当なリンカーを介して連結することによりscFv-Fcとすることもできる。このような遺伝子工学的に修飾（共役）された抗体分子をコードするDNAは、適当なプロモーターの制御下におくことにより大腸菌や酵母などの微生物で発現させることができ、大量に抗体分子を生産することができる。

マウス V_H および V_L をコードするDNAを1つのプロモーターの下流にタンデムに挿

入して大腸菌に導入すると、モノシストロニックな遺伝子発現によりFvと呼ばれる二量体を形成する。また、分子モデリングを用いてV_HおよびV_LのFR中の適当なアミノ酸をCysに置換すると、両鎖の分子間ジスルフィド結合によりdsFvと呼ばれる二量体が形成される。

5 (2) ヒト化抗体

本明細書において「ヒト化抗体」とは、可変領域に存在する相補性決定領域(CDR)以外のすべての領域(即ち、定常領域および可変領域中のフレームワーク領域(FR))の配列がヒト由来であり、CDRの配列のみが他の哺乳動物種由来である抗体を意味する。他の哺乳動物種としては、例えばマウス等の容易にハイ

0 ブリドーマを作製することができる動物種が好ましい。

ヒト化抗体の作製法としては、例えば米国特許第5, 225, 539号、第5, 585, 089号、第5, 693, 761号および第5, 693, 762号に記載される方法あるいはそれらを一部改変した方法などが挙げられる。具体的には、上記キメラ抗体の場合と同様にして、ヒト以外の哺乳動物種(例:マウス)由来のV_HおよびV_LをコードするDNAを単離

5 した後、常法により自動DNAシークエンサー(例: Applied Biosystems社製等)

を用いてシークエンスを行い、得られる塩基配列もしくはそこから推定されるア

ミノ酸配列を公知の抗体配列データベース[例えば、Kabat database (Kabatら,

「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH編, 第5版, 1991参考)

等]を用いて解析し、両鎖のCDRおよびFRを決定する。決定されたFR配列に

類似したFR配列を有するヒト抗体のL鎖およびH鎖をコードする塩基配列[例:

ヒトκ型L鎖サブグループIおよびヒトH鎖サブグループIIもしくはIII(Kabatら, 1991(上述)を参照)]のCDRコード領域を、決定された異種CDRをコードす

る塩基配列で置換した塩基配列を設計し、該塩基配列を20~40塩基程度のフラグ

メントに区分し、さらに該塩基配列に相補的な配列を、前記フラグメントと交互にオーバーラップするように20~40塩基程度のフラグメントに区分する。各フラ

グメントをDNAシンセサイザーを用いて合成し、常法に従ってこれらをハイブリダイズおよびライゲートさせることにより、ヒト由来のFRと他の哺乳動物種由來のCDRを有する V_H および V_L をコードするDNAを構築することができる。より迅速かつ効率的に他の哺乳動物種由來CDRをヒト由来 V_H および V_L に移植するには、PCRによる部位特異的変異誘発を用いることが好ましい。そのような方法としては、例えば特開平5-227970号公報に記載の逐次CDR移植法等が挙げられる。このようにして得られる V_H および V_L をコードするDNAを、上記キメラ抗体の場合と同様の方法でヒト由来の C_H および C_L をコードするDNAとそれぞれ連結して適当な宿主細胞に導入することにより、ヒト化抗体を產生する細胞あるいはトランスジェニック動物植物を得ることができる。

ヒト化抗体もキメラ抗体と同様に遺伝子工学的手法を用いてscFv、scFv-Fc、minibody、dsFv、Fvなどに改変することができ、適当なプロモーターを用いることで大腸菌や酵母などの微生物でも生産させることができる。

ヒト化抗体作製技術は、例えばハイブリドーマの作製技術が確立していない他の動物種に好ましく投与し得るモノクローナル抗体を作製するのにも応用することができる。例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの家畜（家禽）として広く繁殖されている動物やイヌやネコなどのペット動物などが対象として挙げられる。

（3）ヒト抗体產生動物を用いた完全ヒト抗体の作製

内因性免疫グロブリン（Ig）遺伝子をノックアウト（KO）した非ヒト温血動物に機能的なヒトIg遺伝子を導入し、これを抗原で免疫すれば、該動物由來の抗体の代わりにヒト抗体が產生される。従って、マウス等のようにハイブリドーマ作製技術が確立している動物を用いれば、従来のマウスモノクローナル抗体の作製と同様の方法によって完全ヒトモノクローナル抗体を取得することが可能となる。

まず、ヒトIgのH鎖およびL鎖のミニ遺伝子を通常のトランスジェニック（Tg）技術を用いて導入したマウスと、内因性マウスIg遺伝子を通常のKO技術を用いて

不活性化したマウスとを交配して得られたヒト抗体産生マウス (Immunol. Today, 17: 391-397, 1996を参照) を用いて作製されたヒトモノクローナル抗体のいくつかは既に臨床段階にあり、現在までのところ抗ヒトIgヒト抗体 (HAHA) の产生は報告されていない。

その後、Abgenix社 [商品名: XenoMouse (Nat. Genet., 15: 146-156, 1997; 米国特許第5,939,598号等を参照)] やMedarex社 [商品名: Hu-Mab Mouse (Nat. Biotechnol., 14: 845-851, 1996; 米国特許第5,545,806号等を参照)] が酵母人工染色体 (YAC) ベクターを用いてより大きなヒトIg遺伝子を導入したTgマウスを作製し、よりレパートリーに富んだヒト抗体を产生し得るようになった。しかししながら、ヒトIg遺伝子は、例えばH鎖の場合、約80種のV断片、約30種のD断片および6種のJ断片が様々に組み合わされたVDJエクソンが抗原結合部位をコードすることによりその多様性を実現しているため、その全長はH鎖が約1.5Mb (14番染色体) 、κL鎖が約2Mb (2番染色体) 、λL鎖が約1Mb (22番染色体) に達する。ヒトにおけるのと同様の多様な抗体レパートリーを他の動物種で再現するためには、各Ig遺伝子の全長を導入することが望ましいが、従来の遺伝子導入ベクター (プラスミド、コスミド、BAC、YAC等) に挿入可能なDNAは通常数kb～数百kbであり、クローニングしたDNAを受精卵に注入する従来のトランスジェニック動物作製技術では全長の導入は困難であった。

Tomizukaら (Nat. Genet., 16: 133-143, 1997) は、Ig遺伝子を担持するヒト染色体の自然断片 (hCF) をマウスに導入して (染色体導入 (TC) マウス) 、完全長ヒトIg遺伝子を有するマウスを作製した。即ち、まず、H鎖遺伝子を含む14番染色体およびκL鎖遺伝子を含む2番染色体を例えば薬剤耐性マーカー等で標識したヒト染色体を有するヒトマウスハイブリッド細胞を48時間程度紡錘糸形成阻害剤 (例: コルセミド) で処理して、1～数本の染色体もしくはその断片が核膜に被包されたミクロセルを調製し、微小核融合法によりマウスES細胞に染色体を導入する。薬剤を含む培地を用いてヒトIg遺伝子を有する染色体もしくはそ

の断片を保持するハイブリッドES細胞を選択し、通常のK0マウス作製の場合と同様の方法によりマウス胚へ顕微注入する。得られるキメラマウスからコートカラーオーを指標にする等して生殖系列キメラを選択し、ヒト14番染色体断片を伝達するTCマウス系統 (TC(hCF14)) およびヒト2番染色体断片を伝達するTCマウス系統 5 (TC(hCF2)) を樹立する。常法により内因性H鎖遺伝子およびκL鎖遺伝子をK0されたマウス (KO(IgH) およびKO(Igκ)) を作製し、これら4系統の交配を繰り返すことにより、4種の遺伝子改変をすべて有するマウス系統 (ダブルTC/K0) を樹立することができる。

上記のようにして作製されるダブルTC/K0マウスに、通常のマウスモノクローナル抗体を作製する場合と同様の方法を適用すれば、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することができる。しかしながら、κL鎖遺伝子を含むhCF2がマウス細胞内で不安定なため、ハイブリドーマ取得効率は通常のマウスの場合に比べて低いという欠点がある。

一方、前記Hu-Mab MouseはκL鎖遺伝子の約50%を含むが、可変領域クラスターが倍加した構造を有するため完全長を含む場合と同等のκ鎖の多様性を示し (他方、H鎖遺伝子は約10%しか含まないのでH鎖の多様性は低く、抗原に対する応答性が不十分である) 、且つYACベクター (Igκ-YAC) によりマウス染色体中に挿入されてるので、マウス細胞内で安定に保持される。この利点を生かし、TC(hCF14)マウスとHu-Mab Mouseとを交配してhCF14とIgκ-YACとを安定に保持するマウス (商品名: KMマウス) を作製することにより、通常のマウスと同等のハイブリドーマ取得効率および抗体の抗原親和性を得ることができる。

さらに、より完全にヒトにおける多様な抗体レパートリーを再現するために、λL鎖遺伝子をさらに導入したヒト抗体産生動物を作製することもできる。かかる動物は、上記と同様の方法でλL鎖遺伝子を担持するヒト22番染色体もしくは 25 その断片を導入したTCマウス (TC(hCF22)) を作製し、これと上記ダブルTC/K0マウスやKMマウスとを交配することにより得ることもできるし、あるいは、例え

H鎖遺伝子座とL鎖遺伝子座とを含むヒト人工染色体（HAC）を構築してマウス細胞に導入することにより得ることもできる（Nat. Biotechnol., 18: 1086-1090, 2000）。

本発明に用いられる抗体は非中和抗体でなければならないことからモノクローナル抗体であることが望ましいが、抗原として小さなハプテン分子を用いれば、標的抗原の特異的部位に結合する抗体が得られるので、ポリクローナル抗体であっても非中和抗体を得ることは原理的には可能である。本発明に用いられる抗体がポリクローナル抗体である場合には、ハイブリドーマの利用を要しないので、ハイブリドーマ作製技術は確立されていないがトランスジェニック技術は確立されている動物種、好ましくはウシ等の有蹄動物を用いて、上記と同様の方法によりヒト抗体産生動物を作製すれば、より大量のヒト抗体を安価に製造することも可能である（例えば、Nat. Biotechnol., 20: 889-894, 2002参照）。得られるヒトポリクローナル抗体は、ヒト抗体産生動物の血液、腹水、乳汁、卵など、好ましくは乳汁、卵を採取し、上記と同様の精製技術を組み合わせることによって精製することができる。

(4) ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーを用いた完全ヒト抗体の作製
完全ヒト抗体を作製するもう1つのアプローチはファージディスプレイを用いる方法である。この方法はPCRによる変異がCDR以外に導入される場合があり、そのため臨床段階で少数のHAHA産生の報告例があるが、その一方で宿主動物に由来する異種間ウイルス感染の危険性がない点や抗体の特異性が無限である（禁止クローンや糖鎖などに対する抗体も容易に作製可能）等の利点を有している。

ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーの作製方法としては、例えば、以下のものが挙げられるが、これに限定されない。

用いられるファージは特に限定されないが、通常纖維状ファージ（Ffバクテリオファージ）が好ましく用いられる。ファージ表面に外来蛋白質を提示する方法としては、g3p、g6p～g9pのコート蛋白質のいずれかとの融合蛋白質として該コ

ート蛋白質上で発現・提示させる方法が挙げられるが、よく用いられるのはg3pもしくはg8pのN末端側に融合させる方法である。ファージディスプレイベクターとしては、1)ファージゲノムのコート蛋白質遺伝子に外来遺伝子を融合した形で導入して、ファージ表面上に提示されるコート蛋白質をすべて外来蛋白質との融合蛋白質として提示させるもの、2)融合蛋白質をコードする遺伝子を野生型コート蛋白質遺伝子とは別に挿入して、融合蛋白質と野生型コート蛋白質とを同時に発現させるものや、3)融合蛋白質をコードする遺伝子を有するファージミドベクターを持つ大腸菌に野生型コート蛋白質遺伝子を有するヘルパーファージを感染させて融合蛋白質と野生型コート蛋白質とを同時に発現するファージ粒子を産生させるものなどが挙げられるが、1)の場合は大きな外来蛋白質を融合させると感染能力が失われるため、抗体ライブラリーの作製のためには2)または3)のタイプが用いられる。

具体的なベクターとしては、Holtら (Currr. Opin. Biotechnol., 11: 445-449, 2000) に記載されるものが例示される。例えば、pCES1 (J. Biol. Chem., 274: 18218-18230, 1999参照) は、1つのラクトースプロモーターの制御下にg3pのシグナルペプチドの下流にκL鎖定常領域をコードするDNAとg3pシグナルペプチドの下流にCH3をコードするDNA、His-tag、c-myc tag、アンバー終止コドン(TAG)を介してg3pコード配列とが配置されたFab発現型ファージミドベクターである。アンバー変異を有する大腸菌に導入するとg3pコート蛋白質上にFabを提示するが、アンバー変異を持たないHB2151株などで発現させると可溶性Fab抗体を産生する。また、scFv発現型ファージミドベクターとしては、例えばpHEN1 (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) 等が用いられる。

一方、ヘルパーファージとしては、例えばM13-K07、VCSM13等が挙げられる。また、別のファージディスプレイベクターとして、抗体遺伝子の3'末端とコート蛋白質遺伝子の5'末端にそれぞれシステインをコードするコドンを含む配列を連結し、両遺伝子を同時に別個に（融合蛋白質としてではなく）発現させて、

導入されたシステイン残基同士によるS-S結合を介してファージ表面のコート蛋白質上に抗体を提示し得るようデザインされたもの（Morphosys社のCysDisplayTM技術）等も挙げられる。

ヒト抗体ライブラリーの種類としては、ナイーブ／非免疫ライブラリー、合成

5 ライブラリー、免疫ライブラリー等が挙げられる。

ナイーブ／非免疫（non-immunized）ライブラリーは、正常なヒトが保有するV_HおよびV_L遺伝子をRT-PCRにより取得し、それらをランダムに上記のファージディスプレイベクターにクローニングして得られるライブラリーである。通常、正

10 正常人の末梢血、骨髓、扁桃腺などのリンパ球由来のmRNA等が鉄型として用いられ

る。疾病履歴などのV遺伝子のバイアスをなくすため、抗原感作によるクラススイッチが起こっていないIgM由来のmRNAのみを増幅したものを特にナイーブライ

15 ブラリーと呼んでいる。代表的なものとしては、CAT社のライブラリー（J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991; Nat. Biotechnol., 14: 309-314, 1996参照）、

MRC社のライブラリー（Annu. Rev. Immunol., 12: 433-455, 1994参照）、Dyax

5 社のライブラリー（J. Biol. Chem., 1999 (上述); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14: 7969-7974, 2000参照）等が挙げられる。

合成ライブラリーは、ヒトB細胞内の機能的な特定の抗体遺伝子を選び、V遺伝子断片の、例えばCDR3等の抗原結合領域の部分を適当な長さのランダムなアミ

ノ酸配列をコードするDNAで置換し、ライブラリー化したものである。最初から機能的なscFvやFabを産生するV_HおよびV_L遺伝子の組み合わせでライブラリー

20 を構築できるので、抗体の発現効率や安定性に優れているとされる。代表的なものとしては、Morphosys社のHuCALライブラリー（J. Mol. Biol., 296: 57-86, 2000参照）、BioInvent社のライブラリー（Nat. Biotechnol., 18: 852, 2000参照）

25 、Crucell社のライブラリー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3938, 1995; J. Immunol. Methods, 272: 219-233, 2003参照）等が挙げられる。

免疫（immunized）ライブラリーは、癌、自己免疫疾患、感染症等の患者やワ

クチン接種を受けた者など、標的抗原に対する血中抗体価が上昇したヒトから採取したリンパ球、あるいは上記体外免疫法により標的抗原を人為的に免疫したヒトリンパ球等から、上記ナイーブ／非免疫ライブラリーの場合と同様にしてmRNAを調製し、RT-PCR法によって V_h および V_l 遺伝子を増幅し、ライブラリー化したものである。最初から目的の抗体遺伝子がライブラリー中に含まれるので、比較的小さなサイズのライブラリーからでも目的の抗体を得ることができる。

ライブラリーの多様性は大きいほどよいが、現実的には、以下のパンニング操作で取り扱えるファージ数 ($10^{11} \sim 10^{13}$ ファージ) と通常のパンニングでクローニングの単離および増幅に必要なファージ数 (100~1,000 ファージ/クローニング) を考慮すれば、 $10^8 \sim 10^{11}$ クローニング程度が適当であり、約 10^8 クローニングのライブラリーで通常 10^{-9} オーダーのKd値を有する抗体をスクリーニングすることができる。

標的抗原に対する抗体をファージディスプレイ法で選別する工程をパンニングという。具体的には、例えば、抗原を固定化した担体とファージライブラリーとを接触させ、非結合ファージを洗浄除去した後、結合したファージを担体から溶出させ、大腸菌に感染させて該ファージを増殖させる、という一連の操作を3~5回程度繰り返すことにより抗原特異的な抗体を提示するファージを濃縮する。抗原を固定化する担体としては、通常の抗原抗体反応やアフィニティクロマトグラフィーで用いられる各種担体、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス、金属などからなるマイクロプレート、チューブ、メンブレン、カラム、ビーズなど、さらには表面プラズモン共鳴 (SPR) のセンサーチップなどが挙げられる。抗原の固定化には物理的吸着を用いてもよく、また、通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。例えばビオチン (ストレプト) アビジン系等が好ましく用いられる。標的抗原である内因性リガンドがペプチドなどの小分子である場合には、抗原決定基として用いた部分が担体との結合により被覆されないように特に注意す

る必要がある。非結合ファージの洗浄には、BSA溶液などのブロッキング液（1-2回）、Tween等の界面活性剤を含むPBS（3-5回）などを順次用いることができる。クエン酸緩衝液（pH5）などの使用が好ましいとの報告もある。特異的ファージの溶出には、通常酸（例：0.1M塩酸など）が用いられるが、特異的プロテアーゼによる切断（例えば、抗体遺伝子とコート蛋白質遺伝子との連結部にトリプシン切断部位をコードする遺伝子配列を導入することができる。この場合、溶出するファージ表面には野生型コート蛋白質が提示されるので、コート蛋白質のすべてが融合蛋白質として発現しても大腸菌への感染・増殖が可能となる）や可溶性抗原による競合的溶出、あるいはS-S結合の還元（例えば、前記したCysDisplayTMでは、パンニングの後、適当な還元剤を用いて抗体とコート蛋白質とを解離させることにより抗原特異的ファージを回収することができる）による溶出も可能である。酸で溶出した場合は、トリスなどで中和した後で溶出ファージを大腸菌に感染させ、培養後、常法によりファージを回収する。

パンニングにより抗原特異的抗体を提示するファージが濃縮されると、これらを大腸菌に感染させた後プレート上に播種してクローニングを行う。再度ファージを回収し、上述の抗体価測定法（例：ELISA、RIA、FIA等）やFACSあるいはSPRを利用した測定により抗原結合活性を確認する。

選択された抗原特異的抗体を提示するファージクローニングからの抗体の単離・精製は、例えば、ファージディスプレイベクターとして抗体遺伝子とコート蛋白質遺伝子の連結部にアンバー終止コドンが導入されたベクターを用いる場合には、該ファージをアンバー変異を持たない大腸菌（例：HB2151株）に感染させると、可溶性抗体分子が産生されペリプラズムもしくは培地中に分泌されるので、細胞壁をリゾチームなどで溶解して細胞外画分を回収し、上記と同様の精製技術を用いて行うことができる。His-tagやc-myc tagを導入しておけば、IMACや抗c-myc抗体カラムなどを用いて容易に精製することができる。また、パンニングの際に特異的プロテアーゼによる切断を利用する場合には、該プロテアーゼを作用させ

ると抗体分子がファージ表面から分離されるので、同様の精製操作を実施することにより目的の抗体を精製することができる。

このようにして得られた抗体が非中和抗体であるとの確認は、上記の異種モノクローナル抗体の場合と同様に行うことができる。

5 ヒト抗体産生動物およびファージディスプレイヒト抗体ライブラリーを用いた完全ヒト抗体作製技術は、他の動物種のモノクローナル抗体を作製するのにも応用することができる。例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの家畜（家禽）として広く繁殖されている動物やイヌやネコなどのペット動物などが対象として挙げられる。非ヒト動物においては標的抗原の人為的免疫に対する倫理的問題が少ないので、免疫ライブラリーの利用がより有効である。

上記のようにして得られる内因性リガンドに対する非中和抗体（好ましくはモノクローナル抗体）は、必要に応じて薬理学的に許容し得る担体とともに混合して医薬組成物とした後に、該内因性リガンドの血中安定性改善剤として用いることができる。

5 ここで、薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、賦形剤、溶剤（分散剤）、溶解補助剤、懸濁化剤、安定化剤、等張化剤、緩衝剤、pH調節剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、保存剤、抗酸化剤などの製剤添加物を用いることもできる。

賦形剤の好適な例としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 α 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、プルラン、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リングル液、アルコール、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

5 懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオニ酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。

安定化剤の好適な例としては、ヒト血清アルブミン (HSA) 、ピロ亜硫酸ナトリウム、ロンガリット、メタ亜硫酸水素ナトリウムなどが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、
15 D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

pH調節剤の好適な例としては、塩酸、水酸化ナトリウムなどの酸または塩基が挙げられる。

20 無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

保存剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

5 前記医薬組成物の剤形としては、例えば注射剤（例：皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤、動脈内注射剤など）、点滴剤等の注入型製剤

が挙げられる。

医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。以下に、製剤の具体的な製造法について詳述する。医薬組成物中の抗体含量は、剤形、投与量などにより異なるが、例えば
5 約0.1ないし100重量%である。

例えば、注射剤は、抗体を分散剤（例：ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例：メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノールなど）、等張化剤（例：塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖など）などと共に水性溶剤（例：蒸留水、生理的食塩水、リングル液等）あるいは油性溶剤（例：オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油などの植物油、プロピレングリコール等）などに溶解、懸濁あるいは乳化することにより製造される。この際、所望により溶解補助剤（例：サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、安定化剤（例：ヒト血清アルブミン等）、無痛化剤（例：ベンジルアルコール等）等の添加物を用いてもよい。注射液は、必要に応じて、例えばメンブレンフィルター等を用いた濾過滅菌などの滅菌処理を行い、通常、アンプル等の適当な容器に充填される。

注射剤は、上記液剤を真空乾燥などによって粉末とし、用時溶解（分散）して使用することもできる。真空乾燥法の例としては、凍結乾燥法、スピードバックコンセントレーター（SAVANT社）を用いる方法などが挙げられる。凍結乾燥を行う際には、-10°C以下に冷却されたサンプルを用いて、実験室ではフラスコ中で、工業的にはトレイを用いて、あるいはバイアル中で凍結乾燥させることが好ましい。スピードバックコンセントレーターを用いる場合は、0~30°C程度で、約
10mmHg以下、好ましくは約10mmHg以下の真空度で行われる。乾燥させる液剤中には、リン酸塩などの緩衝剤を添加してpHを3~10程度とすることが好ましい。真

空乾燥により得られる粉末製剤は長期間安定な製剤として、用時注射用水、生理食塩水、リングル液等に溶解、もしくはオリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、プロピレングリコール等に分散することにより注射剤とすることができる。

5 上記のようにして得られる本発明の血中安定性改善剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）の皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、動脈内、脳室内に投与することができる。

本発明の血中安定性改善剤の投与量は、投与対象である哺乳動物における内因性リガンドの血中濃度を、該動物が罹患するかもしくは罹患するおそれのある疾患の治療もしくは予防に有効な範囲にまで増加させ得る、および／または該内因性リガンドの血中半減期を当該疾患の治療もしくは予防に有効な程度まで延長させ得る量であれば特に制限はない。例えば、本発明の血中安定性改善剤を内因性GLP-1の血中安定性改善を目的としてヒトに皮下投与する場合、GLP-1およびその機能的フラグメントの血中に必要な濃度は合計100pM程度と見積もられる。すべての血中GLP-1と免疫複合体を形成するために10～100倍量の抗GLP-1抗体が必要であるとすると、必要な血中GLP-1濃度を実現するためには1～10nM程度、重量換算すると10～100 μ g/kg体重程度を1回あたり投与すればよい。この量を、例えば1～数週間毎に投与することができる。

20 しかしながら、投与量は、標的となる内因性リガンドの正常な血中濃度、血中半減期、抗体分子の安定性、リガンドー抗体複合体の組織移行性、抗体の抗原親和性、抗体の中和活性、対象疾患、重症度、さらに動物種、齢、投与経路などによっても異なる。従って、一般的な本発明の血中安定性改善剤の投与量の範囲はより広く、例えば、1回あたり0.1 μ g～10mg/kg程度、好ましくは1 μ g～1mg/kg程度が用いられ得る。

好ましくは、本発明の血中安定性改善剤を哺乳動物に投与した場合の内因性リ

ガンドと抗体との複合体の血中半減期は、該内因性リガンド単独（即ち、遊離状態）の場合の約2倍以上、より好ましくは約10倍以上、特に好ましくは約50倍以上に延長される。かかる延長効果の結果として、本発明の血中安定性改善剤を哺乳動物に投与した場合の内因性リガンドの血中濃度は、該製剤を投与していない場合の血中濃度の約2倍以上、より好ましくは約5倍以上、特に好ましくは約10倍以上となる。ここで血中濃度は投与から次回投与までの任意の時期に測定されたものである。

本発明の血中安定性改善剤は、上記の通り該製剤の有効成分である抗体の作用により内因性リガンドを安定化することができ、しかも該抗体は抗原である内因性リガンドを実質的に中和しないので、該内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させることにより、該リガンドの受容体活性調節作用を増強することが予防・治療上有効である疾患の予防・治療剤として用いられ得る。

かかる疾患としては、例えば、代謝疾患、骨・軟骨疾患、循環器疾患、脳・神経疾患、感染症、ガン、血液疾患、泌尿器疾患、不妊・勃起不全症、成長不全および免疫不全などが挙げられるが、これらに限定されない。

標的抗原となる個々の内因性リガンドとの関連において、対象疾患をさらに詳細に説明すると、代謝疾患としては、例えば糖尿病（標的リガンド：GLP-1、カルシトニン、PACAP、VIP、インシュリン、ベータセルリン、ベータセルリン- δ 4等）、肥満症（標的リガンド：レプチン、アディポネクチン、GPR7/GPR8リガンド（NPW）、MSHなど）、拒食症（標的リガンド：グレリンなど）等；骨・軟骨疾患としては、例えば骨粗鬆症（標的リガンド：カルシトニン、PTHなど）等；循環器疾患としては、例えば虚血性心疾患（心筋梗塞、狭心症）（標的リガンド：グレリン、アドレノメジュリンなど）、高血圧症（標的リガンド：ANP、BNP、CNPなど）等；脳・神経疾患としては、例えば虚血性脳神経障害（標的リガンド：グレリン、VIPなど）、アルツハイマー病（標的リガンド：LH-RHなど）等；

感染症としては、例えばウイルス感染症（標的リガンド：インターフェロン、GM-CSFなど）等；ガンとしては、例えば前立腺ガン、乳ガン（標的リガンド：LH-RHなど）、各種臓器の原発ガンもしくは転移ガン（標的リガンド：メタスチン、インターフェロン、TNF、IL-2、M-CSF、GM-CSFなど）等；血液疾患としては、
 5 例えば貧血症（標的リガンド：EPO、GM-CSFなど）等；泌尿器疾患としては、例えば排尿障害（標的リガンド：ANP、BNP、CNPなど）等；不妊・勃起不全症としては、例えば不妊症（標的リガンド：メタスチンなど）、勃起不全症（標的リガンド：VIPなど）等；成長不全としては、例えば成長ホルモン分泌不全性低身長症（下垂体性小人症）、Turner症候群、Prader-Willi症候群（標的リガンド：成長ホルモン）等；免疫不全としては、例えばHIV感染、移植や自己免疫疾患治療時の免疫抑制剤投与後（標的リガンド：GM-CSFなど）等が挙げられる。

本明細書においてアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC— IUB Commision on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- PAM : フェニルアセタミドメチル
- BHA : ベンツヒドリルアミン
- Boc : t-ブチルオキシカルボニル
- Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
- Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
- Bzl : ベンジル
- OBzl : ベンジルエステル
- Tos : p-トルエンスルホニル
- HOBt : 1-ベンゾトリアゾール
- DCC : N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
- Gly : グリシン

Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

Ile : イソロイシン

5 Ser : セリン

Thr : スレオニン

Cys : システイン

Met : メチオニン

Glu : グルタミン酸

10 Asp : アスパラギン酸

Lys : リジン

Arg : アルギニン

His : ヒスチジン

Phe : フェニルアラニン

15 Tyr : チロシン

Trp : トリプトファン

Pro : プロリン

Asn : アスパラギン

Gln : グルタミン

20

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明の範囲を何ら限定するものではない。

なお、後述の実施例で得られた抗PACAP抗体産生ハイブリドーマは、1990年3月16日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（当時）〔現：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（IPOD）；〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6〕に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞

PA-1N : FERM BP-2811

PA-3N : FERM BP-2812

PA-5N : FERM BP-2813

5 PA-6N : FERM BP-2814

PA-2C : FERM BP-2815

PA-1C : FERM BP-2816

尚、以下の実施例では、上記各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後にaを付けた名称（例えば、PA-1N細胞から得られる抗体はPA-1Na）

10 で表記している。

また、抗GLP-1非中和抗体GLIT2-329(1)24を產生するハイブリドーマ（GLIT2-329(1)24）は、2005年3月17日付で、IPOD（上述）に受領番号FERM ABP-10297を付されて受領されている。

15 参考例 1

(1) PACAP38NH₂の合成

市販のp-メチルBHA樹脂（アプライドバイオシステムズ社製）1.04g (0.5mmole) を用い、ペプチド合成機（アプライドバイオシステムズ社製モデル430A）を使用してPACAP38NH₂（配列番号：1）を合成した。

20 最初のアミノ酸、Boc-Lys(Cl-Z)をHOBr/DCCで活性化し、樹脂に縮合した後、樹脂上のBoc基を50%-トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させ、このアミノ基に、Boc-Asn, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Met, Boc-Ser(Bz1), Boc-Asp(OBz1), Boc-Thr(Bz1), Boc-Phe, Boc-Ile, Boc-His(Tos)をPACAP38NH₂のアミノ酸配列通り、順にHOBr/DCCで活性化し縮合した。さらにDCCまたはHOBr/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ

基は無水酢酸でアセチル化し、保護PACAP38NH₂樹脂2.42gを得た。

この保護PACAP38NH₂樹脂0.51gをp-クレゾール0.6g共存下無水フッ化水素5mlで0°C、60分間処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル5mlで2回洗浄した後、残渣を50%-酢酸水6mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄した。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20(2×90cm)のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS AM120 S-50樹脂カラム(1.6×7cm)に付し、0.1%-トリフルオロ酢酸水と50%-アセトニトリル(0.1%-トリフルオロ酢酸含有)の間での直線型濃度勾配で溶出した。

主要画分を合し、凍結乾燥し、60mgの白色粉末を得た。これを0.05M-酢酸アンモニア水20mlに溶解し、CM-セルロファインの樹脂カラム(1×6cm)に付し、0.05Mから1.0M-酢酸アンモニア水の直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合し、再度YMC-ODSカラム(2.6×7cm)に付し、0~40%までのアセトニトリル水溶液(0.1%-トリフルオロ酢酸含有)の直線型濃度勾配溶出を行い、アセトニトリル28~30%の画分を集め凍結乾燥し、白色粉末21.6mgを得た。

アミノ酸分析値：

Asp 2.90 (3), Thr 0.84 (1), Ser 2.10 (3), Glu 2.21 (2), Gly 2.00 (2)
Ala 3.29 (3), Val 3.19 (3), Met 1.01 (1), Ile 0.87 (1), Leu 2.09 (2)
Tyr 3.94 (4), Phe 0.92 (1), Lys 7.18 (7), His 0.96 (1), Arg 4.19 (4)

質量分析による(M+H)⁺ : 4530

HPLC溶出時間：19.6分

カラム条件

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)

溶離液：A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用い、A液からB液へ直線型濃度勾配溶出(50分)

流速：1.0ml/分

(2) PACAP27NH₂の合成

市販のp-メチルBHA樹脂（アプライドバイオシステムズ社製）1.04g (0.5mmole) を用い、ペプチド合成機（アプライドバイオシステムズ社製モデル430A）を使用してPACAP27NH₂（配列番号：2）を合成した。

最初のアミノ酸、Boc-LeuをHOBr/DCCで活性化し、樹脂に縮合した後、樹脂上のBoc基を50%-トリフルオロ酢酸／塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させ、このアミノ基に、Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Met, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asp(OBzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Phe, Boc-Ile, Boc-His(Tos)をPACAP27NH₂のアミノ酸配列通り、順にHOBr/DCCで活性化し縮合した。さらにDCCまたはHOBr/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ基は無水酢酸でアセチル化し、保護PACAP27NH₂樹脂2.31gを得た。

この保護PACAP27NH₂樹脂0.79gをp-クレゾール1.2g共存下無水フッ化水素10mlで0°C、60分間処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル5mlで2回洗浄した後、残渣を50%-酢酸水5mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄した。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20 (2×75cm) のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS AM120 S-50樹脂カラム (2.6×7cm) に付し、0.1%-トリフルオロ酢酸水と50%-アセトニトリル (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) の間での直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合し、再度YMC-ODSカラム (2.6×7cm) に付し、15~35%までのアセトニトリル水溶液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) の直線型濃度勾配溶出を行い、アセトニトリル30~32%の画分を集め凍結乾燥した。これを0.05M-酢酸アンモニア水20mlに溶解し、CM-セルロファインの樹脂カラム (1×6cm) に付し、水から0.33M-酢酸アンモニア水の直線型濃度勾配で溶出した。主要画分 (0.18~

0.22M) を合して凍結乾燥し、白色粉末20mgを得た。

アミノ酸分析値：

Asp 1.96 (2), Thr 0.94 (1), Ser 2.57 (3), Glu 1.07 (1), Gly 0.95 (1)

Ala 3.00 (3), Val 1.96 (2), Met 0.88 (1), Ile 0.88 (1), Leu 1.93 (2)

5 Tyr 2.87 (3), Phe 0.90 (1), Lys 2.91 (3), His 0.94 (1), Arg 2.17 (2)

質量分析による $(M+H)^+$: 3146.7

HPLC溶出時間：21.2分

カラム条件：

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)

10 溶離液：A液 (0.1%-%トリフルオロ酢酸水)

B液 (0.1%-%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用い、A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (50分)

流速：1.0ml/分

(3) PACAP(14-38)NH₂の合成

15 市販のp-メチルBHA樹脂 (アプライドバイオシステムズ社製) 1.04g (0.5mmole) を用い、ペプチド合成機 (アプライドバイオシステムズ社製モデル430A) を使用してPACAP(14-38)NH₂ (配列番号：3) を合成した。

最初のアミノ酸、Boc-Lys(CL-Z)をHOBT/DCCで活性化し、樹脂に縮合した後、樹脂上のBoc基を50%-%トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させ、このアミノ基に、Boc-Asn, Boc-Lys(CL-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-MetをPACAP(14-38)NH₂のアミノ酸配列通り、順にHOBT/DCCで活性化し縮合した。さらにDCCまたはHOBT/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ基は無水酢酸でアセチル化し、保護PACAP(14-38)NH₂樹脂2.00gを得た。この保護PACAP(14-38)NH₂樹脂0.48gをp-クレゾール0.48g共存下無水フッ化水素5mlで0°C、60分間処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル5mlで

2回洗浄した後、残渣を50%-酢酸水5mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄した。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20 (2×75cm) のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS AM120 S-50樹脂カラム (2.6×7cm) に付し、0.1%-トリフルオロ酢酸水と30%-アセトニトリル (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) の間での直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合して凍結乾燥し、白色粉末20.2mgを得た。

アミノ酸分析値：

Asp 1.01 (1), Glu 2.01 (2), Gly 1.00 (1), Ala 3.01 (3), Val 2.85 (3)

Met 0.86 (1), Leu 2.08 (2), Tyr 1.98 (2), Lys 6.37 (7), Arg 3.24 (3)

質量分析による(M+H)⁺ : 3003.6

HPLC溶出時間：13.1分

カラム条件

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)

溶離液：A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用い、A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速：1.0ml/分

(4) PACAP(1-13)OHの合成

市販のBoc-Tyr(Br-Z)-OCH₂-PAM樹脂 (アプライドバイオシステムズ社製)

0.87g (0.5mmole) を用い、ペプチド合成機 (アプライドバイオシステムズ社製モデル430A) を使用してPACAP(1-13)OH (配列番号：4) を合成した。

樹脂上のBoc基を50%-トリフルオロ酢酸／塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させた後、このアミノ基に、Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-

Ser(Bz1), Boc-Asp(OBz1), Boc-Thr(Bz1), Boc-Phe, Boc-Ile, Boc-His(Tos)をPACAP(1-13)OHのアミノ酸配列通り、順にHOEt/DCCで活性化し縮合した。さらに

DCCまたはHOBt/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ基は無水酢酸でアセチル化し、保護PACAP(1-13)OH₂-PAM樹脂1.86gを得た。

この樹脂0.70gをp-クレゾール0.81g共存下無水フッ化水素10mlで0°C、60分間
5 処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル5mlで2回洗浄した
後、残渣を50%-酢酸水5mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄し
た。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20 (2×75cm)
のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、
0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS AM120 S-50樹脂カラム (2.6
10 ×7cm) に付し、0.1%-トリフルオロ酢酸水と33%-アセトニトリル (0.1%-トリフ
ルオロ酢酸含有) の間での直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合し、再度同
じカラム条件で精製、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末38mgを得た。

アミノ酸分析値：

Asp 2.00 (2), Thr 0.93 (1), Ser 2.43 (3), Glu 1.05 (1), Gly 1.00 (1)
5 Tyr 1.82 (2), Phe 1.02 (1), His 1.13 (1), Arg 1.12 (1)

質量分析による(M+H)⁺ : 1547.5

HPLC溶出時間：12.3分

カラム条件：

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)
溶離液：A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水)
5 B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)
を用い、A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)
流速：1.0ml/分
(5) PACAP(4-27)OHの合成
市販のBoc-Leu-OCH₂-PAM樹脂 (アプライドバイオシステムズ社製) 0.60g
5 (0.5mmole) を用い、ペプチド合成機 (アプライドバイオシステムズ社製モデ

ル430A) を使用してPACAP(4-27)OH (配列番号 : 5) を合成した。

樹脂上のBoc基を50%-トリフルオロ酢酸／塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させた後、このアミノ基に、Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Met, Boc-Ser(Bzl),
5 Boc-Asp(OBzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Phe, Boc-IleをPACAP(4-27)OHのアミノ酸配列通り、順にHOBT/DCCで活性化し縮合した。さらにDCCまたはHOBT/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ基は無水酢酸でアセチル化し、保護PACAP(4-27)OCH₂-PAM樹脂1.08gを得た。

この保護PACAP(4-27)OCH₂-PAM樹脂0.29gをp-クレゾール0.49g共存下無水フッ化水素5mlで0°C、60分間処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル5mlで2回洗浄した後、残渣を50%-酢酸水5mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄した。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20 (2×75cm) のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS
15 AM120 S-50樹脂カラム (2.6×7cm) に付し、15%-アセトニトリル (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) と50%-アセトニトリル (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) の間での直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合して凍結乾燥し、白色粉末33mgを得た。これを0.05M-酢酸アンモニア水20mlに溶解し、CM-セルロファインの樹脂カラム (1×6cm) に付し、水から0.03M-酢酸アンモニア水の直線型濃度勾配で溶出した。主要画分 (0.18~0.22M) を合して凍結乾燥し、白色粉末33mgを得た。
20

アミノ酸分析値：

Asp 1.02 (1), Thr 0.98 (1), Ser 1.78 (2), Glu 1.07 (1), Gly 1.02 (1)
Ala 3.04 (3), Val 1.89 (2), Met 0.81 (1), Ile 0.89 (1), Leu 2.00 (2)
Tyr 2.91 (3), Phe 0.90 (1), Lys 2.89 (3), Arg 2.20 (2)

25 質量分析による(M+H)⁺ : 2808.5

HPLC溶出時間：14.5分

カラム条件：

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)

溶離液：A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

5 を用い、A液からB液の直線型濃度勾配溶出 (35分)

流速：1.0ml/分

(6) PACAP(31-38)NH₂の合成

市販のp-メチルBHA樹脂 (アプライドバイオシステムズ社製) 0.98g

(0.5mmole) を用い、ペプチド合成機 (アプライドバイオシステムズ社製モデ

10 ル430A) を使用してPACAP(31-38)NH₂ (配列番号：6) を合成した。

最初のアミノ酸、Boc-Lys(Cl-Z)をHOBr/DCCで活性化し、樹脂に縮合した後、樹脂上のBoc基を50%-トリフルオロ酢酸／塩化メチレンで処理し、アミノ基を遊離させ、このアミノ基に、Boc-Asn, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Tyr(Br-Z)をPACAP(31-38)NH₂のアミノ酸配列通り、順にHOBr/DCC 15 で活性化し縮合した。さらにDCCまたはHOBr/DCCで活性化した同じアミノ酸誘導体で再度縮合をした後、未反応のアミノ基は無水酢酸でアセチル化し、保護 PACAP(31-38)NH₂樹脂2.00gを得た。

この保護PACAP(31-38)NH₂樹脂0.43gをp-クレゾール0.6g共存下無水フッ化水素 5mlで0°C、60分間処理した後、フッ化水素を減圧留去し、残渣をエチルエーテル 20 5mlで2回洗浄した後、残渣を50%-酢酸水5mlで抽出した。不溶物を濾去し、50%-酢酸水5mlで洗浄した。濾液、洗液を合し、2~3mlに減圧濃縮し、セファデックスLH-20 (2×75cm) のカラムに付し、50%-酢酸で溶出した。主要画分を集め減圧留去の後、残留物を、0.1%-トリフルオロ酢酸水100mlに溶解し、YMC-ODS AM120 25 S-50樹脂カラム (2.6×7cm) に付し、0.1%-トリフルオロ酢酸水と33%-アセトニトリル (0.1%-トリフルオロ酢酸含有) の間での直線型濃度勾配で溶出した。主要画分を合して凍結乾燥し、白色粉末45mgを得た。

アミノ酸分析値：

Asp 1.02 (1), Glu 1.05 (1), Val 1.00 (1), Tyr 0.90 (1), Lys 2.98 (3)
Arg 1.12 (1)

質量分析による (M+H)⁺ : 1062.7

5 HPLC溶出時間：11.6分

カラム条件：

カラム：YMC-ODS (AM-301, S-5 120A)

溶離液：A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

10 を用い、A液からA:B (4:1) 混合液へ直線型濃度勾配溶出 (20分)
流速：1.0ml/分

実施例 1

(1) PACAP38NH₂を含む免疫原の作製

15 上記参考例 1 (1) で得られたPACAP38NH₂と牛サイログロブリン (BTG) との複合体を作製し、免疫原とした。即ち、PACAP38NH₂ 2.8mgとBTG 8.4mgとを1mlの0.1M-リン酸緩衝液 (pH6.9) に溶解させ、最終濃度が0.04%となるようにグルタルアルデヒドを加え、室温で2時間反応させた。反応後、生理食塩水に対し4°Cで2日間透析した。

20 (2) PACAP38NH₂-BTG複合体の免疫

6~8週齢のBALB/C雌マウスに上記 (1) で得られた免疫原PACAP38NH₂-BTG複合体80 μg/匹を完全フロイントアジュvantととともに皮下免疫した。以後4週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュvantととともに2~3回追加免疫した。

実施例 2

(1) 西洋ワサビペーオキシダーゼ (HRP) 標識化PACAP38NH₂の作製

上記参考例1(1)で得られたPACAP38NH₂とHRPとを架橋し、酵素免疫測定法(EIA)の標識体とした。即ち、PACAP38NH₂ 180nmolを500μlの0.1M-リン酸緩衝液(pH6.8)に溶解させ、GMBS 450nmolを含むDMF溶液50μlと混合し、室温で30分反応させた。反応後、セファデックスG-15カラムで分画を行い、マレイミド基の導入されたポリペプチド100nmolを得た。一方、HRP 7.9mg (200nmol)を0.15Mの食塩を含む0.02M-リン酸緩衝液(pH6.8)0.95mlに溶解させ、[N-スクシニミジル-3-(2-ピリミジルジチオ)プロピオネート] (SPDP) 1.54mg (4.9μmol)を含むDMF溶液50μlと混合し、室温で40分間反応させた。反応後、ジチオスレイトール8.2mg (53μmol)を含む0.1M-酢酸緩衝液(pH4.5)0.33mlを加え、室温で20分反応させた後、セファデックスG-25カラムで分画を行い、SH基の導入された酵素6mg (100nmol)を得た。次に、マレイミド基導入PACAP38NH₂ 100nmolとSH基導入HRP 100nmolとを混合し、4°C、16時間反応させた。反応後ウルトロゲルAcA44(LKB-ファルマシア社製)カラムで分画し、HRP標識化PACAP38NH₂を得た。

(2) マウス抗血清中の抗体価の測定

マウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体(IgG画分、カッペル社製)を100μg/ml含む0.1M-炭酸緩衝液(pH9.6)溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4°Cで24時間放置した。次に、プレートをPBSで洗浄した後、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため25%ブロッケース(雪印乳業社製)を含むPBSを300μlずつ分注し、4°Cで少なくとも24時間処理した。上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーE [10%-ブロックエース、2mg/ml 牛血清アルブミン(BSA)、0.4M NaCl、2mM EDTAおよび0.1% NaN₃を含む0.02M-リン酸緩衝液(pH7.0)] 50μlおよびバッファーEで希釈したマウス抗PACAP38NH₂抗血清50μlを加え4°Cで16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄した後、上記実施例2(1)で作製したHRP標識化PACAP38NH₂ [2mg/ml BSA、0.15M NaClを含む0.02M-リン酸緩

衝液 (pH7.0) (バッファーH) で200倍希釈] 100 μ lを加え、室温で6時間反応させた。反応後PBSで洗浄し、固相上の酵素活性を測定するため0.2%-オルソフェニレンジアミン、0.02%-過酸化水素を含む0.1M-クエン酸緩衝液 (pH5.5) を100 μ lずつ分注して、室温で10分間反応させた。4N-硫酸100 μ lを加えて反応を停止させた後、492nmの吸収をプレートリーダー (MTP-32、コロナ社製) で測定した。その結果、免疫した8匹のマウスのうち4匹において抗PACAP38抗体価の上昇が認められた。

実施例 3

10 (1) 細胞融合

上記実施例2において比較的高い血清抗体価を示したマウスNo.5に対して200 μ lの免疫原を生理食塩水0.25mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメディウム (MEM) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3×63.Ag8.U1 (P3U1) を用いた (Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81: 1, 1978)。細胞融合は、原法 (Nature, 256: 495, 1957) に準じて行った。即ち、脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ血清を含有しないMEMで3度洗浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を5:1になるよう混合して、800回転で15分間遠心を行って細胞を沈殿させた。上清を十分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%-ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (コッホライト社製) を0.3ml加え、37°C温水槽中で7分間静置して融合を行った。融合後細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加し、合計12mlのMEMを加えた後600rpmで15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメディウム (和光純薬) (GIT-10FCS) にP3U1が1ml当り 2×10^6 個になるように浮遊させ、24穴マルチディッシュ (リンプロ社製) に1ウェル1mlずつ120ウェルに播種した。播種後、

細胞をCO₂インキュベーター中、37°C、5% CO₂/95%大気の雰囲気下で培養した。

24時間後HAT（ヒポキサンチン1×10⁻⁴ M、アミノプテリン4×10⁻⁷ M、チミジン1.6×10⁻³ M）を含んだGIT-10FCS培地（HAT培地）を1ウェル当り1mlずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧

5 液を1ml捨てた後、1mlのHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約1×10⁶細胞/ml）上清を採取し、抗体価を測定した。

（2）ハイブリドーマのスクリーニング

抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートにバッファーE 50 μlと
10 ハイブリドーマ培養上清50 μlとを加え、室温で6時間反応させた。プレートをPBSで洗浄した後、上記実施例2（1）で作製したHRP標識化PACAP38NH₂ [バッファーHで200倍に希釈] 100 μlを加え、4°Cで16時間反応させた。次に、プレートをPBSで洗浄した後、固相上の酵素活性を上記実施例2（2）記載の方法により測定した。このようにして、ハイブリドーマの増殖が認められた全120ウェルの
15 上清を調べたところ、18ウェルに抗体価が認められた。

（3）クローニング

抗体活性が陽性を示したウェルのうち、No. 44、No. 49、No. 97、No. 113の各ハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。即ち、ハイブリドーマが1.5個/mlになるようRPMI 1640-20FCSに浮遊させ、96穴マイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り0.2mlずつ分注した。分注する際、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞をウェル当り5×10⁵個になるように加えた。約1週間後には細胞の増殖が認められるようになり、上清中の抗体価を上記実施例2（2）記載のEIA法により調べたところ、No. 44のハイブリドーマでは30クローン中28クローンが、No. 49のハイブリドーマでは50クローン中47クローンが、No. 97のハイブリドーマでは50クローン中49クローンが、No. 113のハイブリドーマでは50クローン中48クローンが抗体を產生していた。

これらのクローンのうち、No. 44-2より得られたクローンPA-6Nおよびその產生するモノクローナル抗体PA-6Na、No. 49-3より得られたクローンPA-1Nおよびその產生するモノクローナル抗体PA-1Na、No. 97-2より得られたクローンPA-2Cおよびその產生するモノクローナル抗体PA-2Ca、No. 113-5より得られたクローンPA-5Nおよびその產生するモノクローナル抗体PA-5Naに注目し、以下の実験を実施した。
5 また、同様にして、免疫中の他のマウスの脾臓細胞を用いて細胞融合実験を実施し、No. 28-12より得られたクローンPA-1Cおよびその產生するモノクローナル抗体PA-1CaおよびNo. 10-3より得られたクローンPA-3Nおよびその產生するモノクローナル抗体PA-3Naにも注目し、以下の実験を実施した。

10 (4) モノクローナル抗体の精製

ミネラルオイル0.5mlを腹腔内投与されたマウス、あるいは未処置マウス(BALB/C)に上記ハイブリドーマ1~3×10³細胞/匹を腹腔内注射した後、6~20日後に抗体含有腹水を採取した。この腹水よりプロテインAカラム、あるいはジエチルアミノエチル(DEAE)-セルロースカラムによりモノクローナル抗体を精製した。即ちPA-1Nの腹水6mlを等量の結合緩衝液(3.5M NaCl、0.05% NaN₃を含む1.5M-グリシン(pH9.0))で希釈した後、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したプロテインA-セファロース(ファルマシア製)カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液(0.05% NaN₃を含む0.1M-クエン酸緩衝液(pH3.0))で溶出した。以上の操作により28mgの特異抗体を得た。同様にして、PA-5Nの腹水5mlより23mgの特異抗体を、
15 PA-6Nの腹水7.5mlより13mgの特異抗体を、また、PA-1Cの腹水14mlより45mgの特異抗体を得た。一方、PA-3Nの腹水20mlに最終濃度45%の飽和硫安溶液を加えて塩析後、遠心分離(20,000×g、30分)し、沈殿画分を0.15MのNaClを含む0.02M-ホウ酸緩衝液(pH8)(BBS)に対して透析し、さらに、0.01MのNaClを含む0.01M-リン酸緩衝液に対して透析した。該抗体画分をDEAE-セルロースカラム(2.5×
20 10cm、ワットマン社製DE-52)に供し、NaCl濃度の直線勾配(0.01M~0.35M)
25 100mlで溶出した。以上の操作により特異抗体136mgを得た。同様にして、PA-2C

の腹水7.5mlから特異抗体57mgを得た。

実施例4 モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定

PACAP38NH₂ 5 μg/mlを含む0.1M-炭酸緩衝液 (pH9.6) 溶液を96ウェルマイクロプレートに100 μlずつ分注し、4°Cで24時間放置した。上記実施例5で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をプロックエースでふさぎPACAP38NH₂結合プレートを作製した。次に該プレートにPA-1N、PA-3N、PA-5N、PA-6N、PA-2CまたはPA-1Cの培養上清100 μlを加え、室温で3時間反応させた後、アイソタイプティングキット (Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kitバイオラッド社製) を用いるELISAによってクラス、サブクラスを調べた。その結果PA-1Na、PA-6Na、PA-2CaおよびPA-1CaはIgG1、κ、PA-5NaはIgG2a、κ、PA-3NaはIgG2b、κであった。

実施例5

(1) F(ab')₂画分の調製

PA-6Naをコロジオンバッグ (エムエス機器社製) で8mg/500 μlにまで濃縮した後、0.1M NaClを含む0.1M-酢酸緩衝液に対して透析した。該抗体溶液にペプシン (シグマ社、2回結晶) 0.4mgを加え、37°Cで16時間反応させた後、0.1M-リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したスーパーロース12カラムを用いるFPLC (ファルマシア社製) でF(ab')₂画分を精製した。同様の手法により、PA-1Ca 8.9mgに0.445mgのペプシンを加え、F(ab')₂画分を調製した。

(2) HRP標識化抗PACAPモノクローナル抗体の作製

PA-6Na F(ab')₂画分 [2.2mg (22nmol)/ml] 1mlにGMBS (260nmol) を含むDMF50 μlを加え、室温で40分反応させた。反応液をセファデックスG-25カラム (1×30cm、溶離液、0.1M-リン酸緩衝液 (pH6.7)) で分離し、得られたマレイミド基の導入されたF(ab')₂画分1.5mgと、上記実施例2 (1) 記載の方法により調製されたSH基の導入されたHRP5.5mgとを混合し、コロジオンバッグで約0.3mlにまで

濃縮した後、4°Cで16時間放置した。反応液を溶離液に0.1M-リン酸緩衝液(pH6.5)を用いるウルトロゲルAcA34カラム(10mmφ×40mm)に供し、F(ab')₂-HRP複合体画分を精製した。280nmと403nmの吸光度から、F(ab')₂1分子あたり2.4個のHRPが導入されたことが確認された。同様の方法により、PA-1Ca F(ab')₂画分2.9mgを用いてF(ab')₂-HRP複合体を作製した。さらに、PA-2Ca精製画分6.4mg(43nmolに15倍mol量のGMBSを加え、マレイミド基を導入後、同様の方法により、SH基を導入されたHRPと反応させ、IgG1分子あたり2.4個のHRPが導入された標識体を作製した。

10 実施例6 各モノクローナル抗体が認識する抗原部位の検討

(1) PA-1Na

上記実施例2(2)記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、バッファーHで50倍に希釈したPA-1N培養上清50μl、およびPACAP38NH₂、PACAP27NH₂、PACAP(4-27)OH、PACAP(1-13)OH、PACAP(14-38)NH₂、PACAP(31-38)NH₂あるいはVIP(配列番号:7)のバッファーH溶液50μlを加え、室温で2時間反応させた後、上記実施例2(1)で得られたHRP標識化PACAP38NH₂(バッファーHで100倍希釈)を50μl加え、4°Cで16時間反応させた。反応後PBSで洗浄し、固相上の酵素活性を上記実施例2(2)記載の方法により測定した。結果を図1(a)に示す。PA-1NaがPACAP38NH₂、PACAP27NH₂、PACAP(1-13)OH、PACAP(4-27)OHと反応し、PACAP(14-38)NH₂、PACAP(31-38)NH₂と反応せず、また、VIPとも反応しないことから(交差反応性0.1%以下(対PACAP38NH₂))、該抗体はPACAP38NH₂のN端部分を認識することが分った。

(2) PA-3Na

上記(1)記載の方法により、PA-3Na(PA-3Nの培養上清を50倍希釈)を用いる競合EIAを実施した。結果を図1(b)に示す。PA-3NaがPACAP38NH₂、PACAP27NH₂、PACAP(1-13)OH、PACAP(4-27)OHと反応し、PACAP(14-38)NH₂、

PACAP(31-38)NH₂ と反応せず（交差反応性0.1%以下（対PACAP38NH₂））、一方、VIP とは 1 % の交差反応性を示す（対 PACAP38NH₂）ことから、該抗体は PACAP38NH₂ のN端部分を認識することが分った。

(3) PA-5Na

上記（1）記載の方法により、PA-5Na（PA-5Nの培養上清を70倍希釀）を用いる競合EIAを実施した。結果を図1（c）に示す。PA-5NaがPACAP38NH₂、PACAP27NH₂、PACAP(1-13)OH、PACAP(4-27)OHと反応し、PACAP(14-38)NH₂、PACAP(31-38)NH₂と反応せず、また、VIPとも反応しないことから（交差反応性0.1%以下（対PACAP38NH₂））、該抗体はPACAP38NH₂のN端部分を認識することが分った。なお、PA-1NaとPA-5Naとは、PACAP(1-13)OHとの交差反応性（対PACAP38NH₂）において異っており、該交差反応性は前者が後者の10倍以上強かつた。

(4) PA-6Na

上記（1）記載の方法により、PA-6Na（PA-6Nの培養上清を40倍希釀）を用いる競合EIAを実施した。結果を図1（d）に示す。PA-6NaがPACAP38NH₂、PACAP27NH₂、PACAP(4-27)OHと反応し、PACAP(1-13)OH、PACAP(14-38)NH₂、PACAP(31-38)NH₂と反応せず、また、VIPとも反応しない（交差反応性0.1%以下（対PACAP38NH₂））ことから、該抗体はPACAP38NH₂のN端部分から中央部分に至る領域を認識することが分った。

(5) PA-2Ca

上記（1）記載の方法により、PA-2Ca（PA-2Cの培養上清を340倍希釀）を用いる競合EIAを実施した。結果を図1（e）に示す。PA-2CaがPACAP38NH₂、PACAP(14-38)NH₂と反応し、PACAP27NH₂、PACAP(4-27)OH、PACAP(1-13)OH、PACAP(31-38)NH₂と反応せず、また、VIPとも反応しない（交差反応性0.1%以下（対PACAP38NH₂））ことから、該抗体はPACAP38NH₂のC端部分から中央部分に至る領域を認識することが分った。

(6) PA-1Ca

上記(1)記載の方法により、PA-1Ca (PA-1Cの培養上清を35倍希釈) を用いる競合EIAを実施した。結果を図1(f)に示す。PA-1CaがPACAP38NH₂、PACAP(14-38)NH₂、PACAP(31-38)NH₂と反応し、PACAP27NH₂、PACAP(4-27)OH、5 PACAP(1-13)OHと反応せず、また、VIPとも反応しない(交差反応性0.1%以下(対PACAP38NH₂))ことから、該抗体はPACAP38NH₂のC端部分を認識することが分った。

以上の結果を基に、上記6種の抗PACAPモノクローナル抗体が認識する抗原部位を図2にまとめた。

10

実施例7 抗PACAPモノクローナル抗体の中和活性の検討

ラット副腎褐色細胞腫株PC-12h(大阪大学蛋白研究所、畠中博士(当時)より供与; Brain Res., 222(2): 225-33, 1981)をコラーゲン処理した48ウェルマルチウェルプレート(住友ベークライト社製)上に、 5×10^4 細胞/ウェルの割合で播き、10%のFCSを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で7~10日間培養した。該プレートの培地を0.05%のBSAを含むハンクス液(HBSS:Hanks' balanced salt solution)に変換し、30分間培養した後、上記6種の各抗PACAPモノクローナル抗体(最終濃度2、20あるいは200nM)とあらかじめ4°Cで1時間反応させたPACAP38NH₂(最終濃度2nM)を加えた。さらに2時間培養した後、培養上清中のcAMP濃度をcAMP測定キット(アマシャム社製)で測定した。結果を図3に示す。20 6種の抗PACAPモノクローナル抗体のうち、2種(PA-6NaおよびPA-1Ca)がPACAP38NH₂に対して中和活性を有しないことがわかった。

実施例8 抗PACAP38非中和抗体のDPP-IVによるPACAP分解抑制の検討

25 (1) CaCo-2細胞内在のDPP-IVによる分解作用の抑制効果

CaCo-2細胞(ヒト結腸腺癌由来細胞)に発現したDPP-IV(dipeptidyl

peptidase IV) を用いて、抗PACAP38非中和抗体がDPP-IVによる分解を抑制するかどうか検討した。

Tris-EDTA-CHAPS buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS) 中にCaCo-2細胞膜画分を入れて段階的に希釈した後、終濃度1.0×
5 10^{-8} M PACAP38を 1.3×10^{-7} M PA-6Na存在または非存在の条件下で添加し、4.5 時間37°Cでインキュベートした (実験1)。CaCo-2細胞膜画分へのPACAP38の非選択的な吸着を評価するために、あらかじめDPP-IV阻害剤 ($IC_{50}=5$ nM) を 4×10^{-7} M添加し、実験1と同様の条件でインキュベートした (実験2)。実験1の試料に上記DPP-IV阻害剤を 4×10^{-7} M添加して反応を終結させた後、実験1および2の
0 反応液を10倍に希釈し、Tris-EDTA-Digitonin buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.1% BSA, 0.05% Digitonin, 0.5mM PMSF, 10 μ g/ml Pepstatin A, 20 μ g/ml Leupeptin, 4 μ g/ml E-64) 中に100pM PACAP受容体 (Ohtaki, T. et al.: J Biol Chem 273, 15464-73. (1998) に記載の方法を一部改変して精製) および100pM 125 I-PACAP27 (Ohtaki T et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 838-844) を添加した。75分間25°Cでインキュベートした後、ポリエチレンイミン処理したGF/Fガラスフィルター (Whatman) を用いて吸引ろ過し、フィルター上に捕捉された 125 I-PACAP27の放射活性を γ カウンターにより検出した。測定はtriplicateで実施した。結果を図4に示す。残存放射活性が大きいほど 125 I-PACAP27の受容体結合量が大きく、したがって前もって添加したPACAP38が
0 減少していることを示す。この図から、DPP-IVはPA-6Na非存在下で濃度依存的な PACAP38分解作用を示すが、PA-6Naは調べられたDPP-IVの濃度範囲でPACAP38の分解をほぼ完全に抑制することが判明した。

(2) 組換えDPP-IVによる分解作用の抑制効果

反応条件などはCaCo-2使用時と同一で、CaCo-2膜画分の代りに組換えDPP-IV粗精製品を用いて(1)と同様の実験を行った。組換えDPP-IVを用いることで、CaCo-2膜画分でのPACAP38分解の評価時に問題となつた非選択的結合が減弱し、

基質分解活性も向上した(図5、-□-)。DPP-IV阻害剤の有無にかかわらず、PA-6NaはPACAP38のDPP-IVによる分解を1-100倍希釈のDPP-IV濃度域で抑制した(図5、-■-および-○-)。即ち、DPP-IV阻害剤を事前に添加することなしに、PA-6NaのDPP-IVによるPACAP38分解作用の抑制が明瞭に検出された。

5

実施例9 GLP-1(7-36)amideを含む免疫原の調製

GLP-1(7-36)amide(AnaSpec社製)4mgとBSA 7.2mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)2mlに溶解し、これに0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)で0.1%に希釈したグルタルアルデヒド2mlを静かに滴下して氷冷下で5時間反応させた。反応混合物をカルシウム、マグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(D-PBS(-))に対し透析した後、-80°Cに小分け保存し、これを免疫原として用いた。

実施例10 抗GLP-1抗体濃度の測定(酵素免疫測定法)

抗マウスイムノグロブリンヤギ抗体(IgG画分、ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社製)を0.01M NaCl含有0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)で5μg/mlの濃度に希釈し、これを96ウェルハーフエリアプレート(コーニング社製)に50μlずつ分注し、4°Cで一晩吸着させた。この溶液を除去後、25%ブロックエース(大日本製薬株式会社製)含有D-PBS(-)を100μlずつ添加し、37°Cで1時間処理した。

このプレートを0.05% Tween20含有D-PBS(PBS-T)で洗浄後、0.1% Tween20含有D-PBSで段階希釈した抗血清を50μl添加し、37°Cで1時間反応させた。プレートをPBS-Tで洗浄後、0.1% Tween20含有D-PBS(-)で10 ng/mlに希釈したビオチン標識GLP-1[GLP-1(7-36)-Lys(Biotin), amide](AnaSpec社製)を50μlずつ分注し、37°Cで1時間反応させた。プレートをPBS-Tで洗浄後、0.1% Tween含有D-PBS(-)で0.3μg/mlに希釈した西洋ワサビペーオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジョン(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社製)を50μlずつ分注し、室

温で30分間反応させた。さらにプレートをPBS-Tで洗浄後、HRP基質(TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, バイオラッド社製)を50 μ lずつ分注して発色させ、1N硫酸を50 μ lずつ分注して反応停止後、プレートリーダー(マルチスキャン；ラボシステムズ)を用いて450nmの吸光度を測定した。

5

実施例 1 1

(1) GLP-1(7-36)amide複合体の免疫

実施例 9 で調製したGLP-1(7-36)amide/BSA複合体溶液をフロイント完全アジュバントと等容量混合して作製したエマルションを、BALB/cマウス(13週齢、雌)10匹に50 μ g/匹で皮下免疫した。2回目以降は、GLP-1(7-36)amide/BSA複合体とフロイント不完全アジュバントとで作製したエマルションを2週間隔で免疫した。3回目の免疫1週後に、実施例 1 0 に記載するELISAにおいて高い血清抗体価を示した個体に、上述の免疫原を生理食塩水100 μ lに溶解させたものを静脈内投与することにより最終免疫を行った。

15 (2) 抗GLP-1抗体産生ハイブリドーマの取得

最終免疫から3日後にマウスから脾臓を摘出し、遠心洗浄操作により約10⁸個の脾臓細胞を取得した。この脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞P3X63. Ag8. U1 (P3U1)とを5:1の細胞数比となるよう混合した後、ポリエチレングリコール1500(ロシュ社製)を用い、ケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256: 495, 1957)に準じて融合させた。この融合細胞を10%牛胎児血清を含むIH培地(IMDM(インビトロジェン社製)とHam's F-12(インビトロジェン社製)との等量混合培地)(IH-FCS)に再懸濁させ、96穴マルチウェルプレート(コーニング社製)にP3U1として2×10⁴個/100 μ l/ウェル播種し、CO₂インキュベーターを用いて37°C、5% CO₂濃度で終夜培養した。翌日、各ウェルにヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジンを含むIH-FCS(HAT培地)を100 μ l/ウェル添加し、CO₂インキュベーター内で37°C、5% CO₂濃度下で選択培養した。HAT選択培養は、細胞融合4日後お

より7日後に各ウェルの培養上清の3/4を新鮮なHAT培地に交換し、培養を継続した。細胞融合後8日目から2週間後にかけてハイブリドーマ増殖の見られたウェルの培養上清を実施例10に記載のELISAに供して、15種類の抗GLP-1(7-36)モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ[GLIT1-175(1)18、GLIT1-238(1)6、GLIT1-254(1)6、GLIT1-256(1)31、GLIT1-464(1)15、GLIT1-492(1)2、GLIT2-105(1)6、GLIT2-130(1)36、GLIT2-197(1)66、GLIT2-234(2)65、GLIT2-329(1)24、GLIT2-357(1)10、GLIT2-806(1)4、GLIT2-851(1)11、GLIT2-863(1)35]を選択取得し、限界希釈法によりクローン化株を樹立した。

(3) 抗GLP-1モノクローナル抗体の精製取得

上記で得られた15種類の抗GLP-1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10% Ultra low IgG FCS(インビトロジョン社製)含有IH培地中、CO₂インキュベーターを用いて37°C、5% CO₂濃度で培養し、遠心分離により回収した培養上清をProtein Aカラムクロマトグラフィーに供して精製抗体を得た。これらの精製抗体のサブクラスをIsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit(ロシニ・ダイアグノスティックス社製)を用いて決定した。これらの抗GLP-1抗体は、実施例10に記載のELISAにおいて、ビオチン標識GLP-1(7-36)amideに対し、EC₅₀ : 1×10⁻⁹～1×10⁻¹¹Mの高い結合活性を示した。また、同ELISAにおいて、抗マウスイムノグロブリンヤギ抗体感作プレートに一定濃度の各種抗GLP-1抗体を捕捉させた後、一定濃度(10 ng/mL)のビオチン標識GLP-1(7-36)amideと、これに対して0.003～300倍モル量のGLP-1(7-36)amide(AnaSpec社製)またはGLP-1(9-36)amide(Phoenix Pharmaceuticals社製)とを添加して、結合阻害試験を行った結果、全ての抗体はGLP-1(7-36)amideにより強く阻害されるが、GLP-1(9-36)amideによる阻害を受けない、GLP-1のN末端領域を特異的に認識する抗体であることが分かった。以上の結果を表1にまとめて示す。

[表1] 各種抗GLP-1抗体のビオチン標識GLP-1(7-36)amide結合阻害活性(IC_{50})

抗体クローニング名	ビオチン標識GLP-1(7-36)amide結合阻害活性($IC_{50}(M)$)	
	GLP-1(7-36)amide	GLP-1(9-36)amide
GLIT1-175(1)18	2.5E-09	>1.4E-07
GLIT1-238(1)6	1.9E-09	>1.4E-07
GLIT1-254(1)6	1.4E-09	5.1E-07
GLIT1-256(1)31	2.4E-09	>1.4E-07
GLIT1-464(1)15	1.6E-09	>1.4E-07
GLIT1-492(1)2	1.5E-09	5.8E-07
GLIT2-105(1)6	2.4E-09	>1.4E-07
GLIT2-130(1)36	2.0E-09	>1.4E-07
GLIT2-197(1)66	4.0E-09	>1.4E-07
GLIT2-234(2)65	3.0E-09	>1.4E-07
GLIT2-329(1)24	3.6E-09	2.1E-06
GLIT2-357(1)10	5.8E-09	>1.4E-07
GLIT2-806(1)4	9.0E-09	7.6E-07
GLIT2-851(1)11	2.0E-09	>1.4E-07
GLIT2-863(1)35	2.2E-09	>1.4E-07

5 実施例1 2 抗GLP-1非中和モノクローナル抗体の選定

実施例1 1 で作製した15種類の抗GLP-1モノクローナル抗体の中からGLP-1とGLP-1受容体との結合を阻害しない非中和抗体を選択するために、下記の2種類の活性測定試験を行った。

(1) GLP-1受容体レポータージーンアッセイ

GLP-1受容体を細胞膜表面に発現させ、Multiple Response Element (MRE)/cAMP Response Element (CRE)-luciferase遺伝子を導入した安定発現CHO細胞株を10%牛胎児血清、1 μ g/ml ブラストシン、500 μ g/ml ジェネティシン、50mg/ml ゲンタマイシンを含有するHam's F-12 (インビトロジェン社製) 培地に懸濁させ、96穴ホワイトプレート (コスター社製) に 1×10^4 細胞/1ウェルで播種し、CO₂インキュベーターを用いて37°C、5% CO₂濃度で2日間培養した。培地を吸引除去後、予め室温で1時間反応させておいたGLP-1(7-36)amide (2nM) と1-300倍モル量の精製抗GLP-1モノクローナル抗体との反応混合物 (Ham's F-12 (インビトロジェン社製) で希釈) 100 μ lを添加し、CO₂インキュベーター内で37°C、5% CO₂濃度

下で5.5時間培養した。培地を吸引除去後、ピッカジーンLT-FR（東洋インキ製造社製）とハンクス液（HBSS:Hanks' balanced salt solution）の1:1混合液を40 μ l/ウェル添加し、室温で20分間反応後、Wallac 1420 ARVO_{MX} Multilabel counter(パーキンエルマー・ジャパン社製)を用いてMRE/CREに作用する転写活性

5 をルシフェラーゼの活性を指標に定量した。

(2) GLP-1/GLP-1受容体結合阻害アッセイ

GLP-1受容体を過剰発現させた細胞膜画分は以下のようにして調製した。すなわち、ヒトGLP-1受容体遺伝子を組み込んだpFastBacTMプラスミド(インビトロジエン・ライフテクノロジー社製)から定法により組換えバキュロウイルス液を調製し、これを昆虫細胞株(Sf9)に感染させてGLP-1受容体を一過性発現させた。この感染細胞を遠心分離で回収し、界面活性剤存在下でポリトロン破碎処理した後600 x gで遠心分離して細胞残渣を除き、その上澄液を100,000 x gで超遠心分離してGLP-1受容体を含む膜画分を調製した。

200pMの¹²⁵I標識GLP-1(IM323、アマシャム・バイオサイエンス製)と、これに対して1~1,000倍モル量の抗GLP-1抗体とを混合し、37°Cで1時間インキュベートした後、上記のGLP-1受容体膜画分を添加して室温で75分間インキュベートした後、ポリエチレンイミン処理したグラスフィルター(GF/F、ワットマン製)を用いてB/F分離し、 γ カウンターを用いてGLP-1受容体に結合した¹²⁵I標識GLP-1量を定量した。

20 (1) および(2)の結果を表2にまとめて示す。GLP-1(7-36)amideに対し1,000倍モル量加えてもGLP-1とGLP-1受容体の結合を阻害せず、300倍モル量加えてもGLP-1受容体レポータージーンアッセイにおいてGLP-1活性を中和しない抗体(図6および図7参照)を抗GLP-1非中和抗体とした。得られた2種類の抗GLP-1非中和抗体(表2)の中から、物理的安定性の良好なGLIT2-329(1)24を抗GLP-1非中和抗体として選択し、以下の実験に供した。

[表2] 抗GLP-1抗体のGLP-1受容体レポータージーンアッセイとGLP-1/GLP-1受容体結合阻害アッセイの結果

抗体クローニング名	GLP-1受容体 レポータージーンアッセイ	GLP-1/GLP-1受容体 結合阻害アッセイ
GLIT1-175(1)18	-	++
GLIT1-238(1)6	-	++
GLIT1-254(1)6	+++	+++
GLIT1-256(1)31	++	+
GLIT1-464(1)15	+++	GFに結合
GLIT1-492(1)2	++	+++
GLIT2-105(1)6	-	+
GLIT2-130(1)36	-	+
GLIT2-197(1)66	-	+
GLIT2-234(2)65	-	+
GLIT2-329(1)24	-	-
GLIT2-357(1)10	-	+
GLIT2-806(1)4	-	-
GLIT2-851(1)11	-	+
GLIT2-863(1)35	+	+++

+ : 中和活性あり、- : 中和活性なし、GF : グラスフィルター

5

実施例13 抗GLP-1非中和モノクローナル抗体 (GLIT2-329(1)24) のDPP-IVによるGLP-1(7-36)amide分解抑制作用

実施例12で選択した抗GLP-1非中和モノクローナル抗体 (GLIT2-329(1)24) のDPP-IVによるGLP-1(7-36)amide分解抑制作用をELISA法によって調べた。PBS-T 10 で希釈した抗GLP-1モノクローナル抗体 (GLIT2-329(1)24; 最終濃度5 mg/ml) と Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) (R&Dシステムズ社; 最終濃度200 ng/ml) 混合液に、GLP-1(7-36)amide (最終濃度10 μ g/ml) を添加し、37°Cで12時間反応させた。反応液を95°Cで5分間熱処理後、1800rpmで遠心分離し、上清中に残存するGLP-1(7-36)amide量を以下の方法により測定した。GLP-1(7-36)amideのN末端領域に結合し、GLP-1(9-36)amideには結合しない抗GLP-1抗体 (GLIT1-254(1)6) をD-PBS(-)で0.15 μ g/mlの濃度に希釈し、これを96ウェルハーフエリプレート (コーニング社製) に50 μ lずつ分注し、4°Cで一晩吸着させた。この溶液を除去後、25%ブロックエース (大日本製薬株式会社製) 含有D-PBS(-)を

100 μ lずつ添加し、室温で1時間処理した。このプレートをPBS-Tで洗浄後、0.1% Tween20含有D-PBS(-)で段階希釈した反応液と、0.1% Tween20含有D-PBS(-)で5 ng/mlに希釈したビオチン標識GLP-1(7-36)amideとを25 μ lずつ分注し、37°Cで2時間反応させた。プレートをPBS-Tで洗浄後、0.1% Tween含有D-PBS(-)で0.3 μ g/mlに希釈したHRP標識ストレプトアビシン(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社製)を50 μ lずつ分注し、室温で30分間反応させた。さらにプレートをPBS-Tで洗浄後、HRP基質(TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, バイオラッド社製)を50 μ lずつ分注して発色させ、1N硫酸を50 μ lずつ分注して反応停止後、プレートリーダー(マルチスキャン；ラボシステムズ)を用いて450nmの吸光度を測定した。

抗体非存在下(None)および抗エリスロポエチン抗体(Anti-EPO Ab)存在下では、GLP-1(7-36)amideはDPP-IVによって90%以上分解されたが、抗GLP-1非中和モノクローナル抗体(GLIT2-329(1)24)存在下ではGLP-1(7-36)amideは約10%しか分解されず、この抗GLP-1非中和モノクローナル抗体がDPP-IVによるGLP-1(7-36)amideの分解を抑制し得ることが分かった(図8)。

実施例14 抗GLP-1非中和モノクローナル抗体の*in vivo*投与実験

(1) ラット腹腔内への抗体の投与

飽食状態のWister fattyラット(雌)に生理食塩水、抗GLP-1非中和モノクローナル抗体(GLIT2-329(1)24)または対照としてマウスIgG(ChromoPure mouse IgG, whole molecule; ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社製)を20mg/kg腹腔内投与し、1日後に腹部大動脈より全採血を行い、速やかにDPP-IVインヒビター(DPP4, LINCO Research)を添加した。遠心分離操作により血漿を調製し、冷凍保存した。

(2) ラット血漿中のGLP-1(7-36)amide濃度の測定

ラット血漿中のGLP-1(7-36)amide濃度は下記の前処理を行った後、GLP-1(7-

36) amide測定キット(リンコ社製)を用いて測定した。すなわち、上記各投与群のラットから採取した血漿サンプル0.75 mLに対し、等量のBuffer A (1% TFA in 99% distilled water) を添加した。4°C、5min反応後、遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清を、Buffer Aで平衡化したC18カラム (Sep-column 5 containing 200mg of C18、ペニンシュラ・ラボラトリーズ社製) に通し、Buffer Aで洗浄後、Buffer B(60% acetonitrile in 1% TFA in 39% distilled water)で溶出した。溶出液を減圧濃縮乾固し、残渣を上記ELISAキットに付属のAssay Buffer 375 μ Lに再溶解し、熱処理(95°C、5min)後、遠心分離し、その上清を上記ELISAキットに供してGLP-1(7-36)amide濃度を測定した。なお、ラット10 血漿中にGLP-1(7-36)amideを添加して、サンプルと同様の前処理を行った添加回収実験の結果から、前処理によるGLP-1(7-36)amideの回収率は30%であった。この回収率で補正したラット血漿中GLP-1(7-36)amide濃度を図9に示す。

生理食塩水を投与した飽食Wisterラットの投与1日後の血漿中活性型GLP-1(7-36)濃度は4.7±0.6pMであり、マウスIgG投与群の活性型GLP-1(7-36)濃度は7.1±1.2pMであった。これに対し、抗GLP-1非中和抗体(GLIT2-329(1)24)投与群の活性型GLP-1(7-36)濃度は14.1±4.0pMであり、対照として用いたマウスIgG投与群に比べて有意に高かった (p<0.05)。この結果は、抗GLP-1非中和抗体の投与によりラット生体内の活性型GLP-1(7-36)の血中半減期を延長させ、血中レベルを高められることを示している。

20 なお、Zucker fattyラットに十二指腸より糖負荷する実験系にDPP-IV阻害薬を前投与した報告によれば、化合物によるインスリン分泌促進と血糖上昇抑制が認められた時の血漿中活性型GLP-1濃度の最大値は約10pMであった (Diabetes, 51, 1461-1469, 2002)。この結果から、本実施例の抗GLP-1非中和抗体(GLIT2-329(1)24)投与群で認められた活性型GLP-1(7-36)濃度、14.1±4.0pMは、活性型25 GLP-1の薬効領域であると考えられる。

産業上の利用可能性

本発明の血中安定性改善剤は、動物に投与すると有効成分である非中和抗体が内因性リガンドと結合してこれを安定化し、血中リガンド濃度を増大および／またはリガンドの血中半減期を延長せしめ、該リガンドの受容体活性調節作用を増

5 強し得るので、該受容体活性の異常が関与する疾患の予防・治療に有用である。

特に、ペプチド性化合物等の血中半減期が非常に短い内因性リガンドが関与する疾患、あるいはアゴニストが容易に取得できない受容体が関与する疾患等に有用である。

また、本発明の血中安定性改善剤は、所望の血中リガンド濃度を得るのに十分
10 な抗体量でその効果を奏するので、既存の抗体医薬に比べて臨床投与量を顕著に低減することができ、より安全且つ安価な製剤を提供することができる。従って、医療コストの低減に寄与するとともに、抗体医薬の適応分野の拡大にも大いに寄与する。

15 本出願は、日本で出願された特願2004-098595（出願日：2004年3月30日）を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

請求の範囲

1. 哺乳動物の内因性リガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体を含有してなる該内因性リガンドの血中安定性改善剤。
2. 内因性リガンドの血中安定性の改善によりその受容体活性調節作用が増強されることを特徴とする請求項1記載の剤。
5
3. 抗体の中和活性が約80%以下である請求項1記載の剤。
4. 哺乳動物に投与することにより、内因性リガンドの血中濃度が該抗体を投与していない場合の血中濃度の約2倍以上となる請求項1記載の剤。
5. 内因性リガンドと抗体との複合体の血中半減期が該内因性リガンド単独の場合の約2倍以上である請求項1記載の剤。
10
6. 遊離の内因性リガンドの血中半減期が約1週間以下である請求項1記載の剤。
7. 内因性リガンドがペプチド性化合物である請求項1記載の剤。
8. 内因性リガンドがG蛋白質共役型受容体に対するものである請求項7記載の剤。
15
9. 内因性リガンドがセクレチン／グルカゴンスーパーファミリーに属するものである請求項8記載の剤。
10. 内因性リガンドがGLP-1、カルシトニン、PACAP、VIPおよびそれらの類縁体からなる群より選択される請求項9記載の剤。
20
11. 内因性リガンドがLHRH、メタスチン、GPR7/GPR8リガンド、MSH、グレリン、アペリンおよびその類縁体からなる群より選択される請求項8記載の剤。
25
12. 内因性リガンドがEPO、TPO、インシュリン、インターフェロン、成長ホルモン、GM-CSF、レプチン、アディポネクチンおよびそれらの類縁体からなる群より選択される請求項7記載の剤。
30
13. 内因性リガンドがANP、BNP、CNP、ベーターセルリン、ベータセルリン- δ 4、アドレノメジュリンおよびそれらの類縁体からなる群より選択さ
35

れる請求項 7 記載の剤。

14. 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させることが予防・治療上有効である疾患の予防・治療用である請求項 1 記載の剤。

15. 疾患が代謝疾患、骨・軟骨疾患、循環器疾患、脳・神経疾患、感染症、ガ
ン、血液疾患、泌尿器疾患、不妊・勃起不全症、成長不全および免疫不全からな
る群より選択される疾患の予防・治療剤である請求項 14 記載の剤。

16. 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させる
ことが予防・治療上有効である疾患の予防・治療方法であって、該内因性リガン
ドと同一もしくは実質的に同一の化合物を投与することなく、該内因性リガンド
.0 に対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体の有効量を哺乳動物に
投与して該内因性リガンドの血中安定性を増大させることにより、その受容体活
性調節作用を増強することを特徴とする方法。

17. 内因性リガンドの血中濃度を増加および／または血中半減期を延長させる
ことが予防・治療上有効である疾患の予防・治療剤の製造のための、該内因性リ
.5 ガンドに対して親和性を有し且つ実質的にそれを中和しない抗体の使用。

図 1

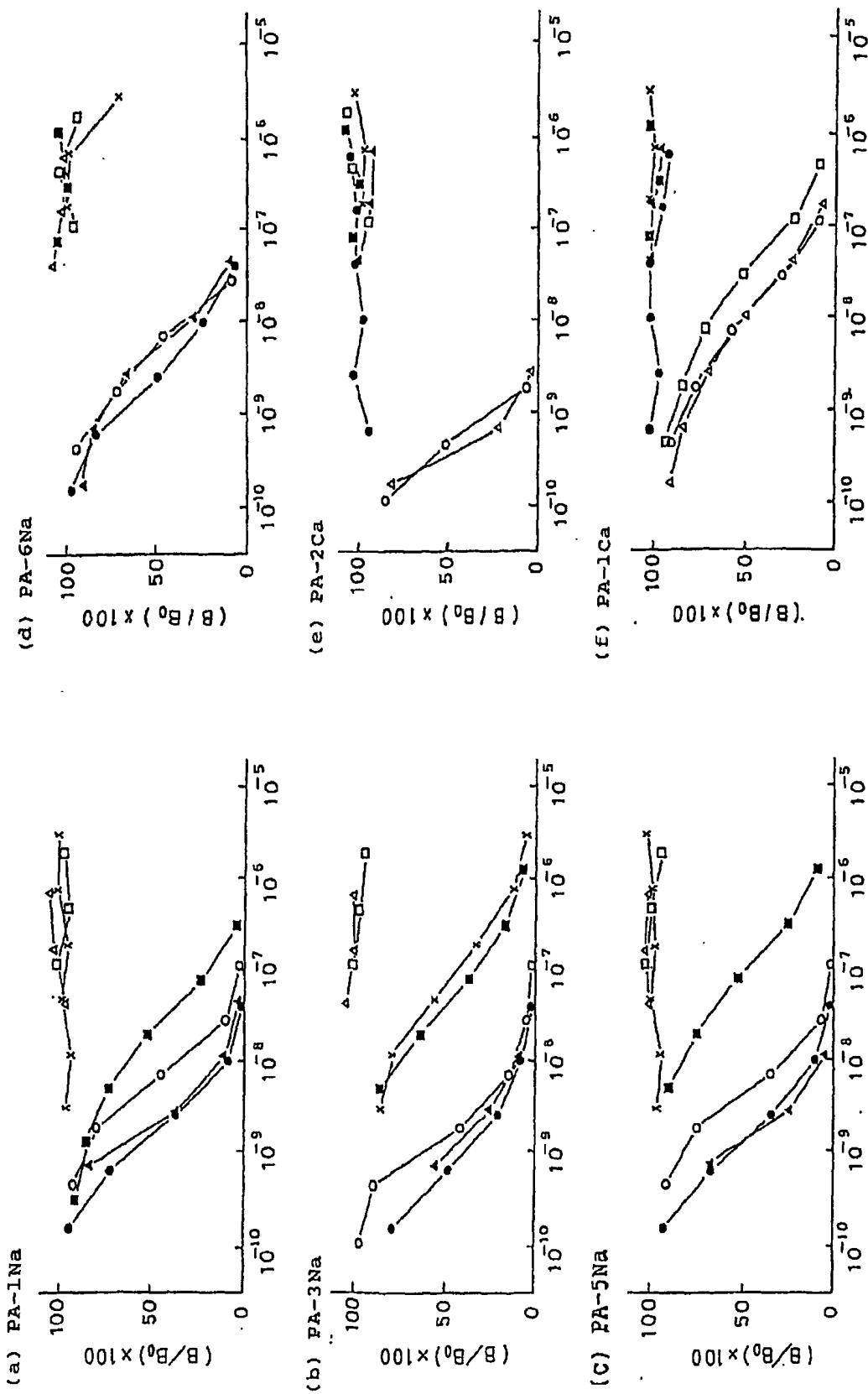


図 2

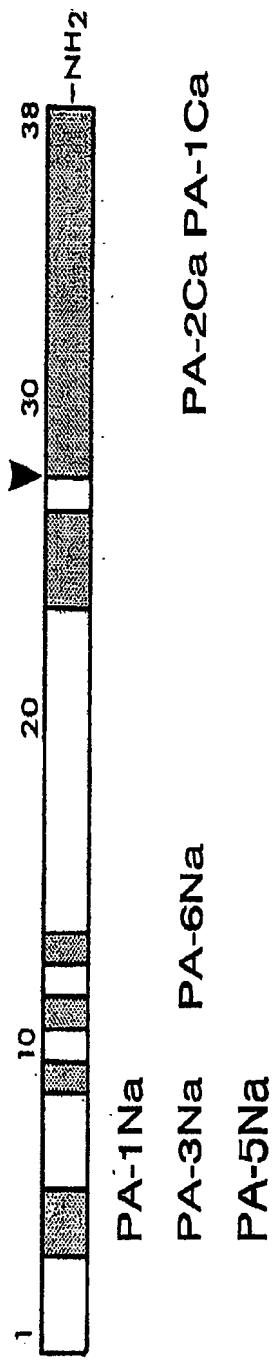


図 3

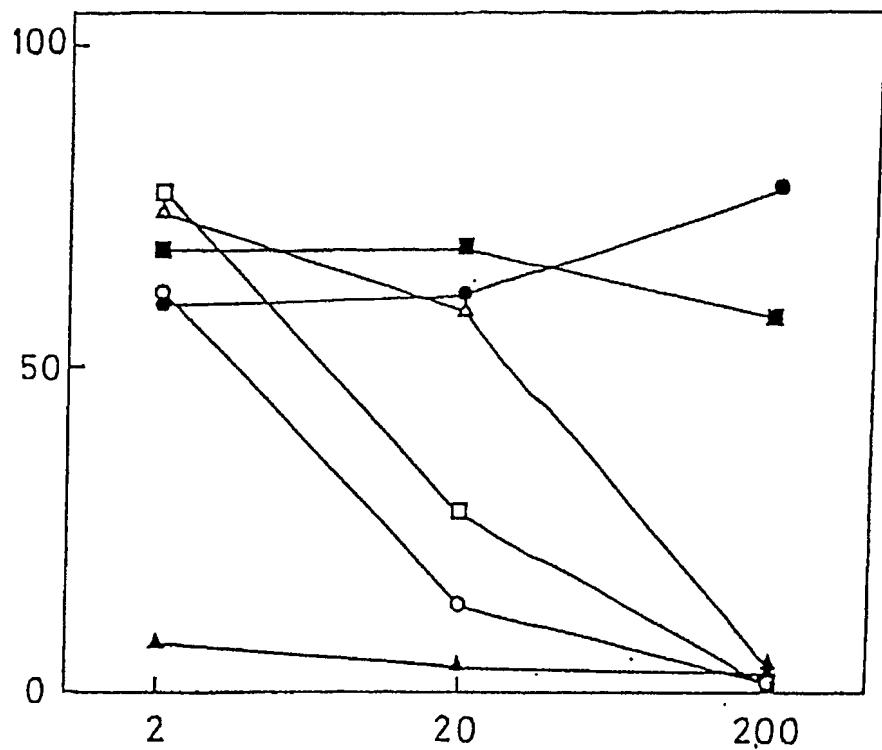


図 4

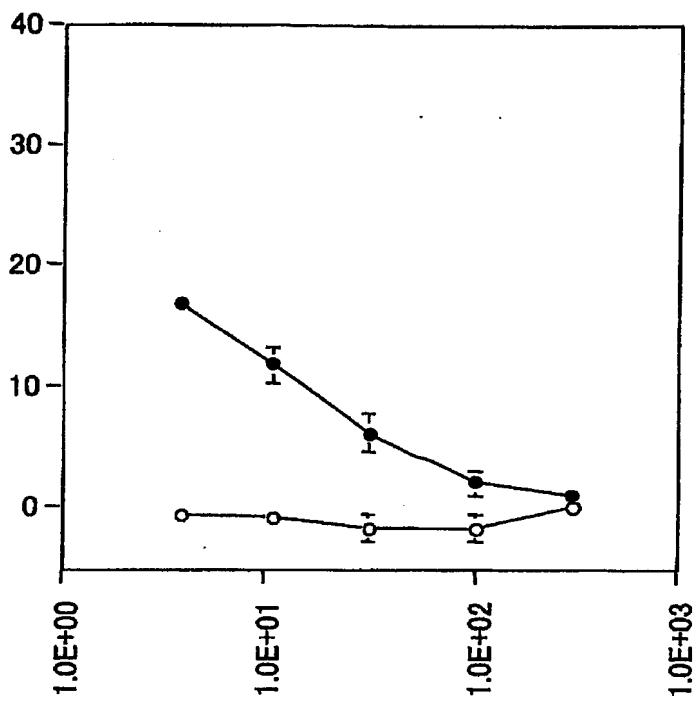


図 5

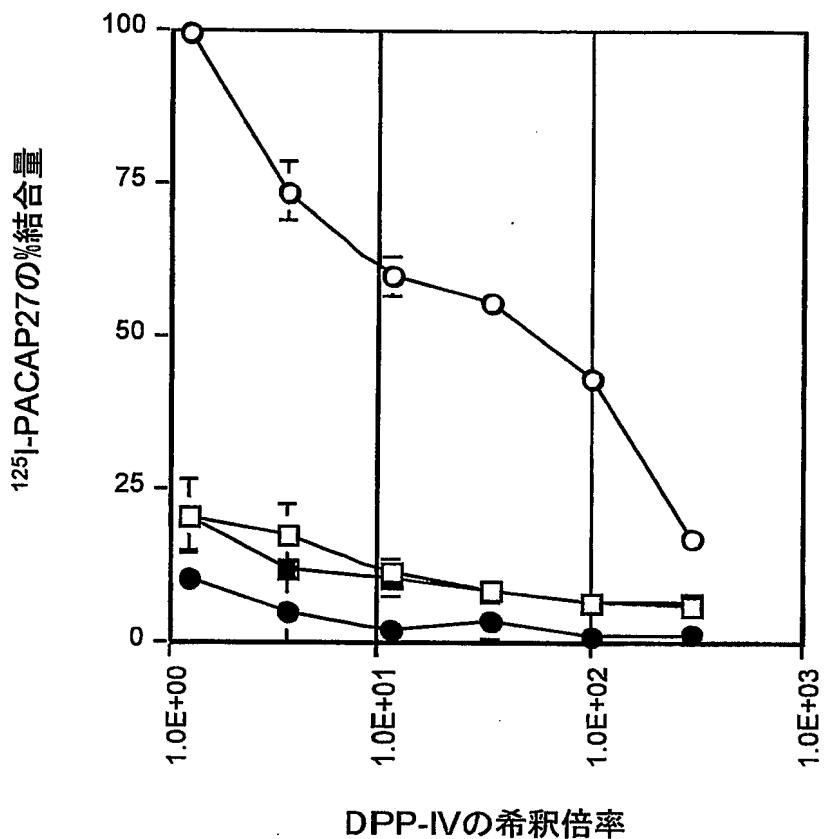


図 6 A

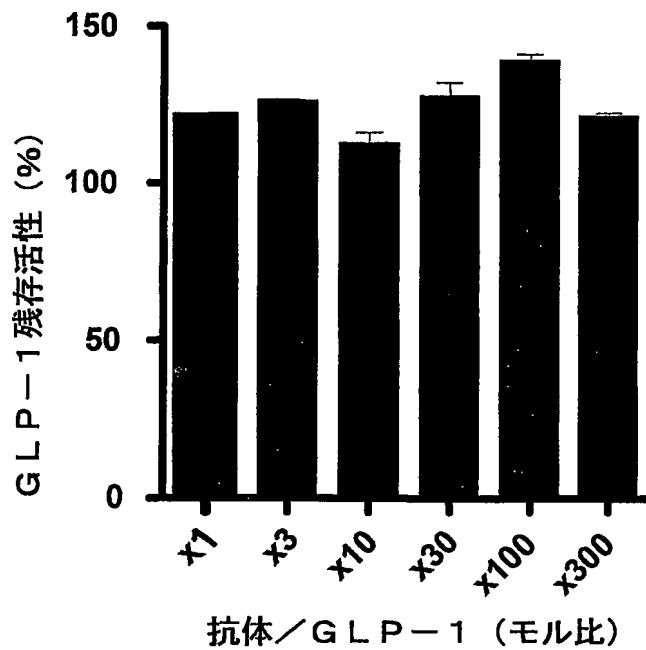


図 6 B

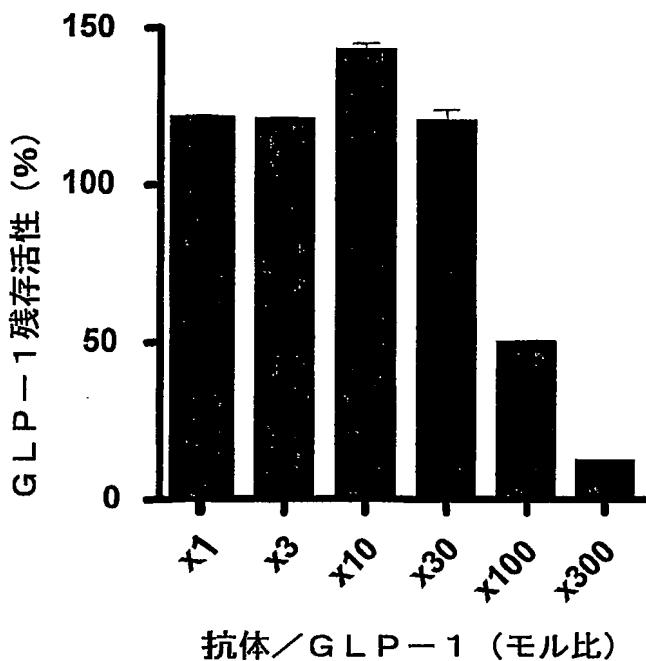


図 7

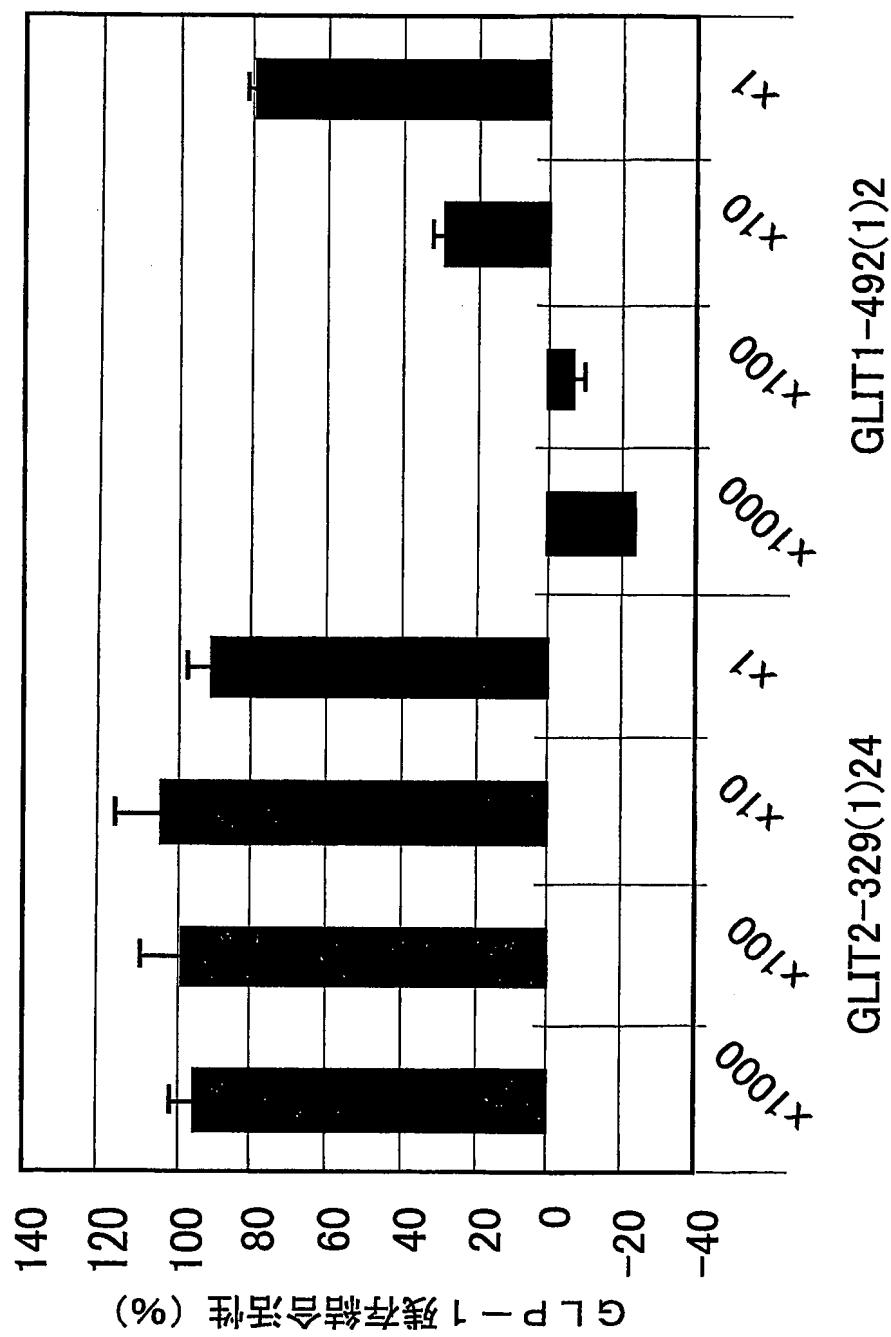


図 8

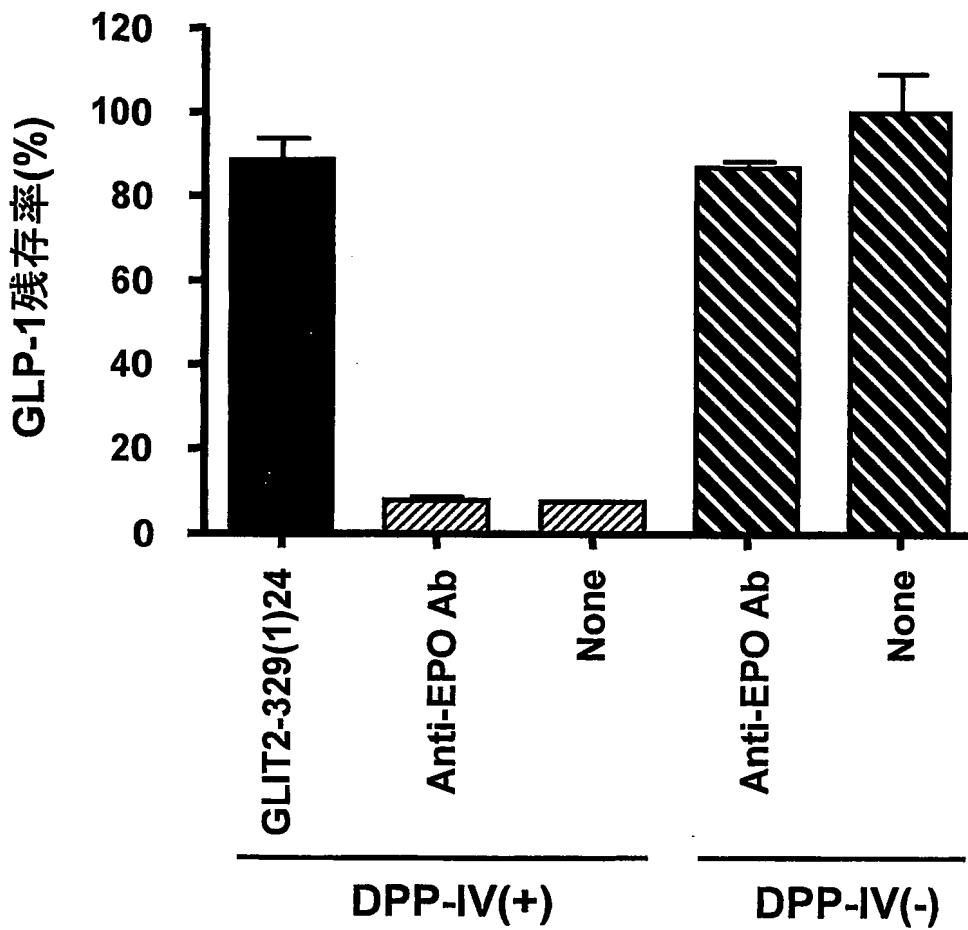
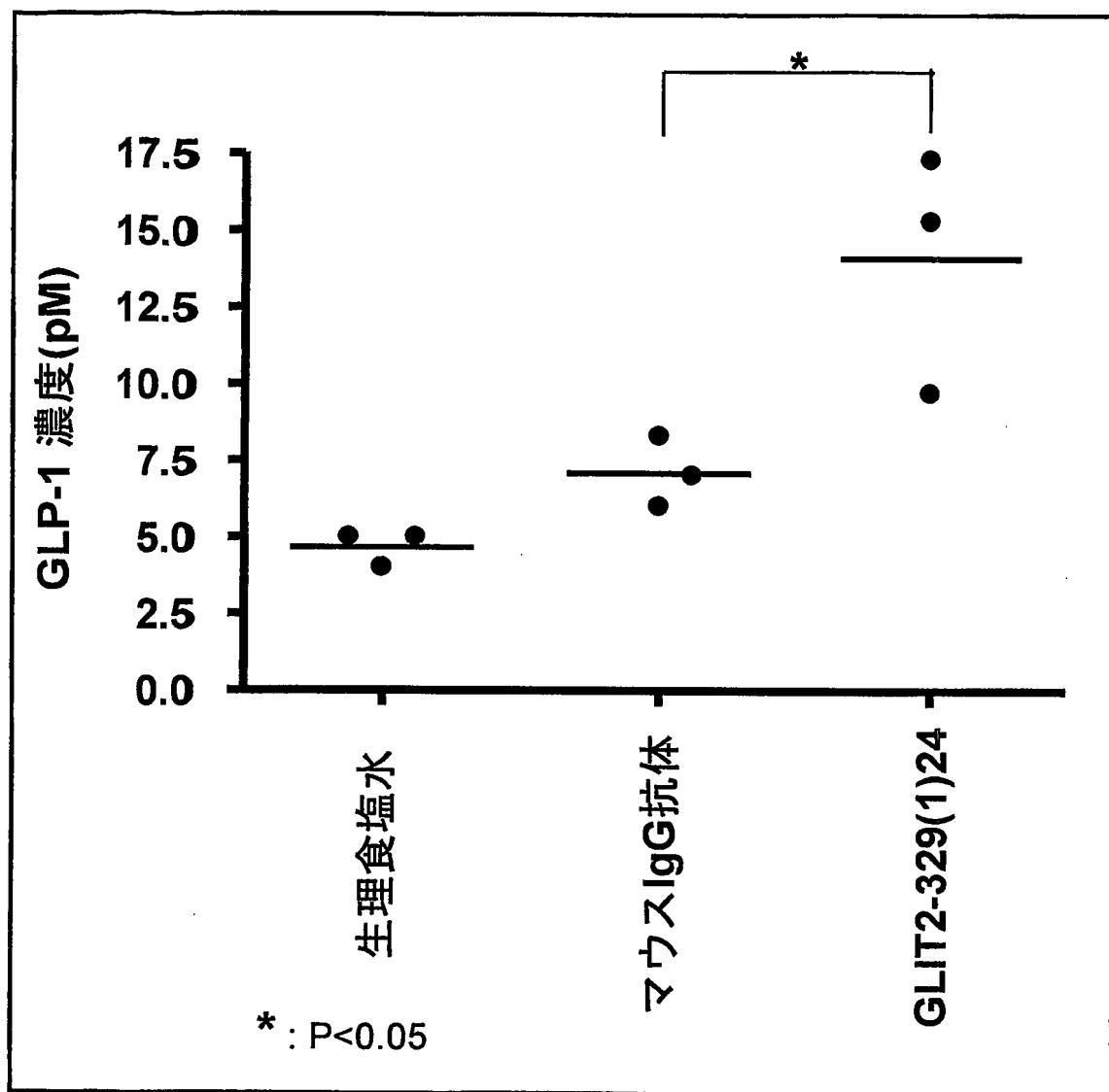


図 9



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Antibody Medicines

<130> 09754

<150> JP2004-098595

<151> 2004-03-30

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> AMIDATION

<400> 1

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> AMIDATION

<400> 2

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide having amino acid sequence identical to
partial amino acid sequence of human PACAP38.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> AMIDATION

<400> 3

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys
1 5 10 15

Arg Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys
20 25

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide having amino acid sequence identical to
partial amino acid sequence of human PACAP.

<400> 4

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr

1 5 10

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide having amino acid sequence identical to partial amino acid sequence of human PACAP.

<400> 5

Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln Met Ala Val
1 5 10 15

Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide having amino acid sequence identical to partial amino acid sequence of human PACAP38.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> AMIDATION

<400> 6

Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys
1 5

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

4/4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> AMIDATION

<400> 7

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ A61K39/395, 47/48, A61P3/00, 5/02, 5/06, 5/18, 5/48, 7/00, 9/00, 15/00, 15/10, 15/18, 19/08, 25/00, 31/00, 35/00, 37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ A61K39/395, 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 60-502104 A (HYBRITECH INC.), 05 December, 1985 (05.12.85), Claims; details of test & EP 467416 A1 & WO 85/974 A1	1-15,17
X	JP 1-138461 A (HYBRISENS LTD.), 31 May, 1989 (31.05.89), Claims & EP 298654 A2 & US 5686579 A	1-15,17
X	JP 4-120025 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 21 April, 1992 (21.04.92), Claims; page 2, upper right column (Family: none)	1-15,17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2005 (26.04.05)Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 3-133378 A (Ivan E. Modrovich), 06 June, 1991 (06.06.91), Claims; examples & US 5660978 A	1-15, 17
X	JP 10-504708 A (Beringu Diagnostics GmbH), 12 May, 1998 (12.05.98), Claims & WO 96/284 A1	1-15, 17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 A61K39/395, 47/48, A61P3/00, 5/02, 5/06, 5/18, 5/48, 7/00, 9/00, 15/00, 15/10, 15/18, 19/08, 25/00, 31/00, 35/00, 37/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 A61K39/395, 47/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 60-502104 A (ハイブリテツク・インコーポレイテツド) 1985.12.05, 請求の範囲, 実験の詳細 & EP 467416 A1 & WO 85/974 A1	1-15, 17
X	JP 1-138461 A (ハイブライセンス・リミテツド) 1989.05.31, 特許請求の範囲 & EP 298654 A2 & US 5686579 A	1-15, 17
X	JP 4-120025 A (中外製薬株式会社) 1992.04.21, 特許請求の範囲, 第2頁右上欄 (ファミリーなし)	1-15, 17

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 05. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4C 3127

清野 千秋

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 3-133378 A (アイバン・イー・モドロビツチ) 1991.06.06, 特許請求の範囲, 実施例 & US 5660978 A	1-15, 17
X	JP 10-504708 A (ベーリング・ダイアグノスティツクス・ゲゼルシ ヤフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 1998.05.12, 特許請求の範囲 & WO 96/284 A1	1-15, 17

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第二欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲16は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第三欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。